

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Єльчіщева Юлія Володимирівна

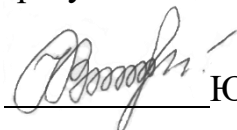
УДК 602.3:582.284]:604.4

ДИСЕРТАЦІЯ
«РОЗРОБКА СПОСОБІВ КУЛЬТИВУВАННЯ КАРОТИНОНОСНИХ
ДРІЖДЖІВ *RHODOSPORIDIUM DIOBOVATUM* IMB Y-5023»

Спеціальність 03.00.20 – «Біотехнологія»
(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

 Ю. В. Єльчіщева

Науковий керівник: Божков Анатолій Іванович, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Сльчіщева Ю. В. Розробка способів культивування каротиноносних дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - «Біотехнологія» (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена розробці таких способів культивування дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023, що дозволять отримати високий вихід біомаси та каротиноїдів даного продуценту, дослідженню складу живильних середовищ та вмісту каротиноїдних пігментів в отриманій біомасі.

Визначено динаміку росту і вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на різних живильних середовищах. Було встановлено, що натуральні живильні середовища забезпечували більш інтенсивний ріст дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 порівняно зі стандартними синтетичними середовищами. Максимальний вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 було отримано на натуральних живильних середовищах, таких як: морквяний екстракт (СМ) і екстракт пшеничних висівок після попереднього культивування *Pleurotus ostreatus* та короткострокової термічної обробки (ВУР). Незалежно від того, на якому середовищі проводити культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 (синтетичному або натуральному), його тривалість повинна становити не менше 120 годин, для отримання максимальної кількості цільових продуктів.

Розроблено способи оптимізації природних нестандартних живильних середовищ для культивування дріжджів. Вони включають попереднє короткострокове (2 доби) культивування *P. ostreatus* на екстракті пшеничних

висівок (ВУ), що супроводжується зміною складу середовища. Така зміна складу середовища супроводжувалась пригніченням росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому середовищі. Короткочасне (5 хв) прогрівання до 100° С модифікованого *P. ostreatus* середовища забезпечувало значно кращий ріст дріжджів на такому середовищі зі збільшенням виходу біомаси як мінімум на 40%. Для модифікованого *P. ostreatus* середовища було характерне багаторазове збільшення вмісту глюкози та інших низькомолекулярних цукрів.

Також було розроблено способи оптимізації живильного середовища післяспиртової барди кукурудзи (яка є промисловим відходом) для культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. Вони включають поділ вихідної кукурудзяної барди шляхом флотації або сепарування на фракції, а також доведення рН барди до 5-6,5. Встановлено, що дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть рости на середовищах, до складу яких входить велика кількість ліпідів. Кукурудзяна барда після її оптимізації може бути використана для промислового виробництва біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, що містить каротиноїди та інші біологічно активні речовини.

Досліджено пігментний склад біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах. Встановлено, що найбільший вихід каротиноїдів був отриманий на синтетичному середовищі УМ. Між виходом біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на різних живильних середовищах у темряві і накопиченням каротиноїдів у їх клітинах не було виявлено прямої залежності. Встановлено, що склад каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 залежить від складу живильного середовища. Серед каротиноїдів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 були виявлені: лікопен, β -каротин, астаксантин, торулоридин.

Визначено вплив освітленості різної інтенсивності на ріст і синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах. Встановлено, що культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можна здійснювати в темряві. Освітленість

спричиняла різний ефект на накопичення біомаси дріжджів і вміст каротиноїдів у ній, в залежності від середовища культивування. Освітленість впливала на кількісний склад каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* IMB Y-5023 і не чинила впливу на їх якісний склад.

Досліджено вплив складу живильних середовищ на вихід біомаси і каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Встановлено, що дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 здатні рости на середовищах з низьким вихідним вмістом глюкози (0,33 г/л). Виявлено відсутність прямої кореляції або наявності зворотної кореляції між кількістю спожитої глюкози і виходом біомаси на досліджуваних живильних середовищах. Найбільша ефективність перетворення спожитих цукрів у біомасу за культивування в темряві спостерігалася на середовищі ВУР.

Визначення складу цукрів у досліджуваних середовищах до та після культивування дріжджів, а також розрахований коефіцієнт ефективності перетворення спожитих цукрів у біомасу та каротиноїди, показали, що склад цукрів у середовищі культивування визначає метаболічну спрямованість дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Встановлено наявності кореляції між різними фракціями спожитих цукрів і досліджуваними параметрами: на середовищі СМ пряма кореляція була виявлена між лікопеном і кількістю спожитої фруктози; на середовищах УМ і ВУР така кореляція спостерігалася між β -каротином і кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів і пентасахаридів, а також між лікопеном і кількістю спожитих пентасахаридів. На середовищі УМ також була виявлена пряма кореляція між вмістом торулородину і кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів, пентасахаридів і гексасахаридів.

Таким чином, наукова новизна отриманих даних полягає у наступному. Показано, що екстракти пшеничних висівок можуть бути використані як субстрат для культивування каротиноносних дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Послідовне культивування на екстракті пшеничних висівок *P. ostreatus* \rightarrow *R. diobovatum* IMB Y-5023 забезпечувало збільшення виходу біомаси цих

дріжджів на 40 % порівняно з екстрактом висівок без попереднього культивування *P. ostreatus*. Розроблено схему послідовного культивування *P. ostreatus* → *R. diobovatum* IMB Y-5023, яке дозволяє отримати як мінімум два цільових продукта: міцелій *P. ostreatus* і біомасу дріжджів.

Вперше встановлено, що на відміну від більшості інших каротинсинтезуючих організмів (таких як: водорості, бактерії, гриби, в т.ч. дріжджі), *R. diobovatum* IMB Y-5023 можуть культивуватися в темряві, світло не являється стимулюючим фактором росту і каротиногенезу цих дріжджів.

Показано, що освітленість впливала на кількісний склад каротиноїдних пігментів і не впливала на їх якісний склад. Вперше у складі каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* IMB Y-5023 було виявлено атаксантин і показана можливість отримання лікопену, а також загальних каротиноїдів у великих кількостях у біомасі цих дріжджів - до 25 мг/г сухої маси.

Вперше встановлена відсутність прямої кореляції між вмістом глюкози та інших моносахаридів у середовищі культивування й накопиченням біомаси дріжджів, а також показана наявність кореляції між вмістом у середовищах культивування таких олігосахаридів як три-, тетра-, пента- і гексасахаридів і вмістом каротиноїдів, зокрема, β - каротину та торулородину в біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Дисертаційна робота має практичне значення. Одержані дані дозволяють запропонувати способи культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, в результаті яких можна отримати біомасу із значним вмістом каротиноїдів. Розроблено спосіб послідовного культивування, який дозволяє не тільки збільшити вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023, а й отримати два цільових продукта.

Отримані результати досліджень дають змогу використання різних способів регуляції росту, синтезу каротиноїдних пігментів та їх якісного складу дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Показана можливість використання різних промислових відходів у якості живильних середовищ для культивування цих дріжджів та способи їх оптимізації.

Показано, що *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть бути використані як для отримання біомаси, так і для отримання каротиноїдів у біотехнологічному виробництві, з можливістю підвищення його рентабельності.

Результати роботи використовуються в освітньому процесі на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна у рамках спеціального курсу: «Об'єкти біотехнології» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загального курсу біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Біотехнологія». (Акт впровадження).

Ключові слова: *Rhodospiridium diobovatum*, дріжджі, живильне середовище, ріст, біомаса, послідовне культивування, ліпіди, освітленість, каротиноїдні пігменти, моносахариди, олігосахариди

ABSTRACT

Ielchishcheva Iu.V. Development of cultivation methods for carotene-accumulating yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023. — Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for the degree of candidate of biological science in speciality 03.00.20 — "Biotechnology" (Biological sciences). — V.N. Karazin Kharkiv National University - National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is devoted to the development of cultivation methods of yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, which will allow to obtain a high yield of this producer's biomass and carotenoids, the study of nutrient media composition and carotenoids content in the obtained biomass.

The growth dynamics and biomass yield of yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023 on different nutrient media was determined. It has been found that natural nutrient media provide more intensive growth of *R. diobovatum* IMB Y-5023 compared to standard synthetic media. The maximum biomass yield of yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023 was obtained on natural nutrient media, such as carrot extract (CM), and wheat bran extract after preliminary cultivation of *Pleurotus ostreatus* and short-term heat treatment (BYP). Regardless of the medium used for *R. diobovatum* IMB Y-5023 cultivation (synthetic or natural), it should continue at least for 120 hours to obtain maximum amount of target products.

The methods for optimization of natural non-standard nutrient media for yeast cultivation have been developed. They include preliminary short-term (2 days) cultivation of *P. ostreatus* on wheat bran extract (BY), accompanied by changes in medium composition. Such changes in medium composition were accompanied by inhibition of *R. diobovatum* IMB Y-5023 growth on this medium. Short-term (5 min) heating to 100°C of modified *P. ostreatus* medium provided much better yeast growth on such medium with biomass yield, increased for at

least 40%. Modified *P. ostreatus* medium was characterized by multiple increase in content of glucose and other low molecular weight sugars.

The methods for optimization of distillery corn vinasse (which is an industrial waste) nutrient medium for *R. diobovatum* IMB Y-5023 cultivation have been also developed. They include separation of source corn vinasse by flotation or dividing into fractions, as well as bringing vinasse pH up to 5 - 6.5. It has been found that yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023 can grow on media, containing a large amount of lipids. After optimization, corn vinasse may be used for industrial production of *R. diobovatum* IMB Y-5023 biomass, which contains carotenoids and other biologically active substances.

Pigment composition of *R. diobovatum* IMB Y-5023 biomass, when cultured on different nutrient media, was investigated. It has been established that the highest carotenoids yield is obtained on synthetic YM medium. There was no direct dependence between the biomass yield of *R. diobovatum* IMB Y-5023 on different nutrient media in the dark and the accumulation of carotenoids in their cells. It has been discovered that the composition of carotenoid pigments in *R. diobovatum* IMB Y-5023 depends on the nutrient medium composition. Among carotenoids of *R. diobovatum* IMB Y-5023 there were identified the following pigments: β -carotene, astaxanthin, lycopene and torularhodin.

The effect of illumination of various intensity on *R. diobovatum* IMB Y-5023 growth and carotenoid synthesis, when cultured on the investigated nutrient media, was determined. It has been established that *R. diobovatum* IMB Y-5023 may be cultured in the dark. Illumination caused a different effect on yeast biomass accumulation and carotenoid content in it, depending on the culture medium. Illumination had an impact on the quantitative composition of *R. diobovatum* IMB Y-5023 carotenoid pigments and had no effect on their qualitative composition.

The impact of nutrient media composition on *R. diobovatum* IMB Y-5023 biomass yield and carotenogenesis has been investigated. It has been established that yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023 can grow on medium with low output glucose content (0.33 g/l). An absence of direct correlation, or a presence of

reverse correlation between the amount of consumed glucose and the biomass yield on the studied nutrient media has been found. The highest efficiency of conversion of consumed sugars into biomass, when cultured in the dark, was observed on BYP medium.

Defining of sugars composition in the investigated media before and after yeast cultivation, as well as calculated efficiency ratio of consumed sugars conversion into biomass and carotenoids, demonstrated that sugars composition in the culture medium determines metabolic direction of *R. diobovatum* IMB Y-5023. The correlation between different fractions of consumed sugars and studied parameters has been established: on CM medium, a direct correlation is found between lycopene and the amount of consumed fructose; on YM and BYP media, such correlation is observed between β -carotene and the amount of consumed disaccharides, tetrasaccharides and pentasaccharides, as well as between lycopene and the amount of consumed pentasaccharides. On YM medium, a direct correlation was found between the content of torularhodin and the amount of consumed disaccharides, tetrasaccharides, pentasaccharides and hexasaccharides.

Thus, the scientific novelty of the obtained data is as follows.

It has been demonstrated that wheat bran extracts may be used as a cultivation substrate for carotene-accumulating yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023. Sequential cultivation on wheat bran extract of *P. ostreatus* \rightarrow *R. diobovatum* IMB Y-5023 provided increase of yeast biomass yield by 40%, compared to bran extract without *P. ostreatus* culturing. The scheme of sequential cultivation of *P. ostreatus* \rightarrow *R. diobovatum* IMB Y-5023 has been developed. It allows to obtain at least two target products: *P. ostreatus* mycelium and yeast biomass.

It was established for the first time, that unlike most other carotene synthesizing organisms (such as algae, bacteria, fungi, including yeast), *R. diobovatum* IMB Y-5023 may be cultivated in the dark; light is not a stimulating factor for growth and carotenogenesis of these yeast.

It has been shown that the illumination has an impact on the quantitative composition of carotenoid pigments, and does not affect their qualitative

composition. For the first time, astaxanthin has been found among the carotenoid pigments of *R. diobovatum* IMB Y-5023, and it has been shown a possibility to obtain lycopene, as well as total carotenoids, in large amounts within the yeast biomass — up to 25 mg/g of dry mass.

For the first time, it has been established an absence of direct correlation between the content of glucose and other sugars in the culture medium, and the yeast biomass yield, as well as demonstrated a correlation between the content of oligosaccharides such as tri-, tetra-, penta- and hexasaccharides in the culture media, and the content of carotenoids, in particular, β - carotene and torulorodin in *R. diobovatum* IMB Y-5023 biomass.

The thesis has a practical value. The obtained data allow us to suggest the ways of *R. diobovatum* IMB Y-5023 cultivation, which can result in biomass with high carotenoid content. The sequential cultivation method, which allows both increase *R. diobovatum* IMB Y-5023 biomass yield, and receive two target products, has been developed.

The obtained research results allow to use various methods for growth regulation, synthesis of carotenoid pigments and their qualitative composition in yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023.

The possibility for using of different industrial wastes as nutrient media for these yeast culturing, and ways of their optimization have been shown.

It has been shown that *R. diobovatum* IMB Y-5023 may be used both for biomass production and for carotenoids production in biotechnological manufacturing, having the possibility for its profitability increase.

The results of the work are used in the educational process at the Department of Molecular Biology and Biotechnology of V.N. Karazin Kharkiv National University, within a special course: "Objects of Biotechnology" in the specialty "Molecular Biology and Biotechnology (Biology)" for 4th-year-students at biological faculty for Bachelor's Degree, as well as in the general course "Biotechnology" at biological faculty of V.N. Karazin Kharkiv National University. (Implementation Act).

Key words: *Rhodosporidium diobovatum*, yeast, nutrient medium, growth, biomass, sequential cultivation, lipids, illumination, carotenoid pigments, monosaccharides, oligosaccharides

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. **Ю. Єльчішева, А. Голтвянський.** Ріст і вміст каротиноїдів дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 на натуральних і синтетичних живильних середовищах // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015. № 70. С. 221–229. (Google Scholar). *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів Rh. diobovatum IMB Y-5023, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».*

Статті в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз

2. Anatoliy Goltvianskiy, **Iuliia Ielchishcheva**, Barbara Stachowiak, Artur Szwengiel, Anatoliy Bozhkov. Preculture of *Pleurotus ostreatus* Increases the Yield of Yeast Biomass // **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 2015. Vol. 4, № 3, P. 124-133. (Index Copernicus, CiteFactor, OAJI, CAS, Universitätsbibliothek Leipzig тощо). *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси дріжджів, підготовлено зразки живильних середовищ до аналізу їх складу, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».*
3. **Iuliia Ielchishcheva**, Anatoliy Bozhkov, Anatoliy Goltvianskiy, Natalia Kurguzova. The Effect of Lipid Components of Corn Vinasse on the Growth Intensity of Yeast *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 // **International**

- Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.** 2016. Vol. 5, №10. P. 467-477. (Index Copernicus, CiteFactor, OAJI, CAS, Universitätsbibliothek Leipzig тощо). «Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, а також розроблено способи оптимізації кукурудзяної барди, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».
4. **Iuliia Ielchishcheva**, Barbara Stachowiak, Artur Szwengiel, Anatoliy Bozhkov. Carbohydrate components of culture media as determinants of the *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 yeast metabolism // *Nauka Przyroda Technologie.* 2017. Vol. 11, № 3. P. 291–303. (Index Copernicus, Agro, Arianta, CABI, DOAJ, EBSCO). «Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, підготовлено зразки живильних середовищ до аналізу їх вуглеводного складу, розраховано коефіцієнт ефективності перетворення субстрату на біомасу та каротиноїди, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».
5. **Iuliia Ielchishcheva**, Barbara Stachowiak, Artur Szwengiel, Anatoliy Bozhkov. Growth and carotenogenesis in *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023: effects of culture medium and illumination intensity // *FEMS Microbiology Letters.* 2018. Vol. 365, № 1. P. 1-8. ([Web of Science](#), Scopus тощо; Impact Factor: 1,765). «Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ та освітленості різної інтенсивності на вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, підготовлено зразки біомаси дріжджів до аналізу їх пігментного складу, проаналізовано отримані дані

та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

6. **Ельчищева Ю. В.,** Кургузова Н. И. Влияние липидных компонентов кукурузной барды на особенности роста и накопление биомассы дрожжей штамма *Rhodospiridium diobovatum* // «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки»: матеріали X Міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців, 19-23 березня 2012 р. Київ, 2012. С. 107-108. *«Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».*
7. Голтвянський А., **Єльчіщева Ю.** Оцінка ефекту стимуляції інтенсивності росту дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* продуктами життєдіяльності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* // Молодь і поступ біології: збірник тез IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського, 16-19 квітня 2013 р. Львів, 2013. С. 154-155. *«Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».*
8. **Ельчищева Ю. В.,** Голтвянский А. В. Характеристика роста и биомассы мицелия *Pleurotus ostreatus* (JACQ.) P. KUMMER в жидких культурах // Матеріали VI Міжнародної наукової конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченої 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В. І. Липського, 13-17 травня 2013 р. Одеса, 2013. С. 271-272. *«Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».*

9. **Ельчищева Ю. В.,** Голтвянский А. В. Оптимизация питательной среды для культивирования дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* // Ukrainian biochemical journal: матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р. Київ, 2014. Vol. 86, № 5 (2). Р. 192-193. «Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

10. **Ельчищева Юлия Владимировна,** Голтвянский Анатолий Владимирович. Влияние экзометаболитов базидиомицета *Pleurotus ostreatus*, полученных в жидкой культуре, на интенсивность роста дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* // Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии. Сборник статей по материалам XIV международной заочной научно-практической конференции. 2014. №2 (14). С. 107-114. «Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту дріжджів *Rh. diobovatum* IMB Y-5023, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ позначень	22
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1 Характеристика каротинсинтезуючих дріжджів <i>Rhodosporidium diobovatum</i> IMB Y-5023	31
1.2 Ріст клітин у культурі	35
1.3 Чинники, що впливають на ріст та синтез метаболітів каротинсинтезуючих дріжджів.....	37
1.3.1 Джерела живлення	37
1.3.2 Вплив рН, аерації, температури, світла на ріст і каротиногенез мікроорганізмів.....	41
1.4 Метаболізм каротиноїдів дріжджів.....	44
1.4.1 Різноманітність і поширення каротиноїдів у природі	44
1.4.2 Загальна характеристика каротиноїдів	46
1.4.3 Вміст каротиноїдів у клітинах дріжджів різних видів	49
1.4.4 Функції каротиноїдів у клітинах дріжджів.....	50
1.4.5 Поглинання світла і фотохімічні властивості каротиноїдів	51
1.4.6 Особливості синтезу каротиноїдів у грибів	52
1.4.7 Можливі шляхи біосинтезу каротиноїдів	54
1.4.8 Розщеплення каротиноїдів	56
1.4.9 Регуляція каротиногенезу.....	57
1.5 Основні проблеми біотехнологічного процесу	57
Висновки до розділу 1:	58
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	60
2.1 Об'єкти дослідження.....	60
2.1.1 Дріжджі <i>Rhodosporidium diobovatum</i> IMB Y- 5023	60

2.1.2	Дріжджі <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> DSM 5626	60
2.1.3	Базидіальний гриб <i>Pleurotus ostreatus</i> НК-35	61
2.1.4	Базидіальний гриб <i>Lentinula edodes</i> ІБК-353	62
2.2	Живильні середовища, що були використані для культивування дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y- 5023	62
2.3	Послідовне культивування	64
2.3.1	Отримання культуральних фільтратів міцеліального гриба <i>P. ostreatus</i> та <i>L. edodes</i>	64
2.3.2	Визначення оптимальної пропорції компонентів живильного середовища ВУ (екстракт пшеничних висівок 3%, екстракт дріжджів 1%) для отримання середовища ВУР і оптимального часу термічної обробки цього середовища для подальшого культивування дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y- 5023	64
2.3.3	Дизайн експерименту	65
2.4	Умови культивування дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y- 5023	66
2.5	Визначення динаміки росту та виходу сухої біомаси дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y- 5023	66
2.6	Визначення впливу інтенсивності освітленості на ріст та синтез каротиноїдів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y- 5023	66
2.7	Екстракція каротиноїдів і визначення їх складу	67
2.8	Визначення вмісту моно- і олігосахаридів у середовищах культивування	68
2.9	Визначення загального вмісту ліпідів у кукурудзяній барді (CV)	69
2.10	Визначення складу сухого залишку досліджуваних середовищ ВУ та ВУР	70
2.10.1	Визначення вологості	70
2.10.2	Визначення вмісту золи	70
2.10.3	Визначення вмісту жиру сирого	70

2.10.4	Визначення вмісту загального нітрогену	70
2.10.5	Визначення вмісту загального протеїну	70
2.10.6	Визначення вмісту клітковини сирової	70
2.10.7	Визначення вмісту БЕР (безазотистих екстрактивних речовин) ..	70
2.10.8	Визначення вмісту кальцію	70
2.10.9	Визначення вмісту фосфору	70
2.11	Визначення вмісту загального азоту в досліджуваних середовищах YM, BYP, CM	71
2.12	Визначення вмісту загального вуглецю в досліджуваних середовищах YM, BYP, CM	71
2.13	Статистичні методи	71
РОЗДІЛ 3 РІСТ <i>R. DIOBOVATUM</i> IMB Y-5023 НА РІЗНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ		73
3.1	Динаміка росту та вихід біомаси дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на класичних середовищах Рідера та YM	74
3.2	Динаміка росту дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на натуральних живильних середовищах	76
3.2.1	Динаміка росту та вихід біомаси дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на середовищі з екстракту висівок пшениці (BY) та культуральному фільтраті <i>P. ostreatus</i> (BYP)	77
3.2.2	Динаміка росту та вихід біомаси дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на кукурудзяній барді (CV)	80
3.2.3	Вихід біомаси дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на живильному середовищі з екстракту моркви (CM)	81
Висновки до розділу 3:		82
РОЗДІЛ 4 ПОСЛІДОВНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>P. OSTREATUS</i> , <i>L. EDODES</i> → КАРОТИНСИНТЕЗУЮЧІ ДРІЖДЖІ		84
4.1	Тривалість культивування міцелію <i>P. ostreatus</i> та <i>L. edodes</i>	85

4.2	Вплив термічної обробки культуральних середовищ <i>P. ostreatus</i> та <i>L. edodes</i> на ріст дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023	88
4.3	Підбір оптимальної концентрації компонентів контрольного середовища ВУ та оптимальної тривалості термічної обробки середовища ВУР	93
4.4	Характеристика контрольного та модифікованого середовищ	95
	Висновки до розділу 4:	98
РОЗДІЛ 5 ВИКОРИСТАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ У ЯКОСТІ СУБСТРАТІВ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ДРІЖДЖІВ <i>R. DIOBOVATUM</i> IMB Y-5023		
5.1	Способи модифікації кукурудзяної барди (CV)	99
5.1.1	Визначення оптимального значення рН кукурудзяної барди для росту дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023	100
5.1.2	Поділ кукурудзяної барди на три фракції та динаміка росту <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на них	101
5.2	Визначення вмісту загальних ліпідів у 3-х фракціях кукурудзяної барди і їх впливу на ріст <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023	103
	Висновки до розділу 5:	109
РОЗДІЛ 6 КАРОТИНОГЕНЕЗ ДРІЖДЖІВ <i>R. DIOBOVATUM</i> IMB Y-5023..		
6.1	Визначення динаміки накопичення каротиноїдів у клітинах <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023	110
6.2	Визначення складу та кількості каротиноїдних пігментів у біомасі <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 на досліджуваних синтетичних та натуральних живильних середовищах у темряві	114
6.3	Взаємозв'язок між накопиченням біомаси дріжджів <i>R. diobovatum</i> IMB Y-5023 та вмістом каротиноїдних пігментів у ній за культивування на досліджуваних живильних середовищах у темряві	117

6.4	Вивчення впливу видимого світла різної інтенсивності на накопичення біомаси та синтез каротиноїдних пігментів дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах.....	118
6.4.1	Вихід біомаси та загальний вміст каротиноїдних пігментів дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при різній інтенсивності освітленості	119
6.4.2	Якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при різній інтенсивності освітленості.....	123
6.4.3	Аналіз отриманих результатів з використанням статистичних методів.....	131
6.5	Вивчення впливу складу досліджуваних живильних середовищ на ріст та синтез каротиноїдів дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023	135
6.5.1	Визначення вихідного вуглеводного складу живильних середовищ YМ, ВYР, СМ до культивування дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023 та після 5 діб росту у темряві та при різній інтенсивності освітленості.....	137
6.5.2	Ефективність перетворення спожитих цукрів клітинами дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023 у біомасу та каротиноїди за їх культивування на досліджуваних живильних середовищах у темряві та при освітленості з різною інтенсивністю	140
6.5.3	Вуглецево-азотний (C/ N) баланс живильних середовищ YМ, ВYР, СМ та його взаємозв'язок з виходом біомаси та синтезом каротиноїдних пігментів дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023.....	143
6.5.4	Багатовимірний аналіз результатів	145
6.5.5	Кореляція між кількістю спожитих фракцій цукрів та накопиченням біомаси й каротиноїдами дріжджів <i>R. diobovatum</i> ІМВ Y-5023 за їх культивування на середовищах YМ, ВYР, СМ при освітленості з різною інтенсивністю	146

Висновки до розділу 6:	149
ВИСНОВКИ	151
Список використаних джерел.....	151
ДОДАТОК 1	173
ДОДАТОК 2	177
ДОДАТОК 3	179
ДОДАТОК 4	181
ДОДАТОК 5	183

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

СМ – живильне середовище (10% - й морквяний екстракт з 1% глюкози, 0,1% пептону, 0,1% NaCl, pH=5,0);

УМ - живильне середовище (1% глюкози, 0,5% пептону, 0,5% мальтотріози, 0,3% екстракту дріжджів, 2,5% екстракту солоду, pH=5,0);

ВУ - живильне середовище (екстракт пшеничних висівків 3%, екстракт дріжджів 1%);

ВУР - живильне середовище (культуральне середовище міцеліального гриба *Pleurotus ostreatus* після 2 росту мицелію на середовищі ВУ, й після термічної обробки при T=100°C, протягом 5 хвилин);

ВУЛ - живильне середовище (культуральне середовище міцеліального гриба *Lentinula edodes* після 2 росту мицелію на середовищі ВУ й після термічної обробки при T=100°C, протягом 5 хвилин);

СВ - живильне середовище (кукурудзяна барда, отримана внаслідок виробництва спирту);

ВФ - верхня фракція кукурудзяної барди;

СФ – середня фракція кукурудзяної барди;

НФ – нижня фракція кукурудзяної барди;

ЄДС - єдина динамічна система;

МГК - метод головних компонент;

ГК - головні компоненти;

КА - кластерний аналіз;

ДП2 - дисахариди;

ДП3 - трисахариди;

ДП4 - тетрасахариди;

ДП5 - пентасахариди;

ДП6 - гексасахариди.

ВСТУП

Актуальність теми. Отримання кормового і харчового білку, повноцінного за амінокислотним складом, являється одним із завдань сучасної біотехнології. Дефіцит повноцінного білку в раціоні людей і тварин призводить до серйозних наслідків: порушення росту і розвитку [1], втрати маси і пригнічення активності ферментативних систем, що викликає виникнення цілого ряду різних патологій [2, 3].

Разом з цим, найважливішими компонентами харчування для нормального функціонування організму є вітаміни та інші біологічно активні речовини, у тому числі каротиноїди. Як відомо, нестача вітамінів також призводить до порушення багатьох процесів в організмі, зокрема, зміни активності ферментів, виникнення багатьох захворювань, зменшення тривалості життя [4, 5].

Особливу роль у метаболізмі відіграють каротиноїдні пігменти, які не синтезуються в організмі людини й тварин, тому вони повинні надходити з їжею в необхідній кількості. Каротиноїди мають антиоксидантні, протипухлинні, радіопротекторні, антисклеротичні, протизапальні та імуномодулюючі властивості, деякі з них є попередниками вітамінів, зокрема, β -каротин є попередником вітаміну А [6, 7]. Вони підвищують резистентність організму до мутагенних та канцерогенних факторів [8].

Щорічно на рак захворює 10 мільйонів людей, вмирає 6,2 мільйона людей, при цьому 80 % онкологічних захворювань залежить від способу життя. 30-50 % пухлин виникає через незбалансоване харчування, зокрема з низьким вмістом каротиноїдів [9, 10, 11].

Збагачення раціону харчування каротиноидами (β -каротином -6-8 мг щодня) дозволяє знизити ризик раку легенів у 2-3 рази, раку стравоходу в 3-5 разів, шийки матки в 3-5 разів [12, 13].

Згідно з останніми дослідженнями BBC (Report Code: FOD025E), світовий ринок каротиноїдів становив \$ 1,5 млрд у 2014 році, очікується, що

цей ринок досягне майже \$ 1,8 млрд у 2019 році, із середнім темпом річного приросту (CAGR) 3,9 % [14].

В наш час мікробіологічний синтез каротиноїдів є однією з галузей біотехнології, що найбільш інтенсивно розвивається. Його перевага полягає в тому, що він може бути здійснений у контрольованих умовах, на відміну від рослин. Мікроорганізми легко культивуються і швидко розмножуються, часто на дешевих живильних середовищах, а вміст пігментів відносно стабільний і не залежить від географічного положення та кліматичних умов [15]. Здатність синтезувати каротиноїди виявлена в обмеженій кількості мікроорганізмів, серед яких найбільш відомими бактерії *Flavobacterium* [16] і *Micrococcus* [17], мікроводорості *Dunaliella* [18] і *Haematococcus pluvialis* [19, 20, 21], пліснява *Blakeslea trispora* [22] та базидіальні дріжджі *Xanthophyllomyces dendrorhous* [23], *Sporobolomyces* і *Rhodotorula* [24].

Разом з цим об'єктом для отримання каротиноїдних пігментів можуть бути й дріжджі *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, дослідженню яких, на жаль, біотехнологи не приділяли належної уваги. Ці дріжджі становлять великий інтерес для біотехнології не тільки завдяки своїй здатності синтезувати каротиноїдні пігменти [25], а й накопичувати досить велику кількість ліпідів у своїй біомасі [26], а також тим, що вони мають антибіотичну дію по відношенню до деяких збудників хвороб рослин [27].

Однак, можливість отримання біомаси та каротиноїдів *R. diobovatum* IMB Y-5023 вивчена недостатньо, але є актуальною для сучасної біотехнології.

Відомо, що швидкість накопичення каротиноїдів у клітинах мікроорганізмів залежить не тільки від генотипу, але й від умов культивування [28]. Проте, вплив умов культивування на ріст дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 і на їх каротиногенез залишається малодослідженим. Разом з цим, ці знання необхідні як для їх практичного застосування в біотехнології, так і для розуміння механізмів регуляції каротиногенезу *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано у відділі клітинної біології та біотехнології НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна відповідно до НДР №ДР 0112U000099 «Дослідження епігенетичних механізмів індукованої резистентності до токсичної дії важких металів на різних етапах онтогенезу», №0115U000485 «Розробка концепції «динамічних функціональних мереж» на рослинних і тваринних моделях».

Мета та задачі досліджень. Метою роботи була розробка таких способів культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, що дозволять отримати високий вихід біомаси та каротиноїдів даного продуценту.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні **задачі**:

1. Визначити динаміку росту і вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на різних живильних середовищах.
2. Розробити способи оптимізації природних нестандартних живильних середовищ для культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.
3. Вивчити пігментний склад біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах.
4. Визначити вплив освітленості різної інтенсивності на ріст і синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах.
5. Визначити вплив складу живильних середовищ на вихід біомаси і каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Об'єкт досліджень: біотехнологічні процеси отримання каротинвмісної біомаси на основі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Предмет досліджень: закономірності накопичення біомаси, біосинтезу каротиноїдів штамом дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Методи досліджень. У роботі використані мікробіологічні методи (культивування базидіоміцетів), метод високоефективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією (вміст загальних каротиноїдів, якісний склад каротиноїдів, вміст моно- і олігосахаридів у

середовищах культивування), метод зважування (біомаса дріжджів), мікроскопічні методи (кількість клітин дріжджів), спектрофотометричні методи (вміст загальних каротиноїдів у біомасі: вміст загальних ліпідів, загального вуглецю і загального азоту в середовищі культивування), статистичні методи обробки даних (програмний пакет Statistica version 10 (StatSoft Inc., OK, US)).

Наукова новизна одержаних результатів. *Наукова новизна* результатів досліджень, отриманих особисто здобувачем, полягає у наступному:

У роботі вперше:

- Показано, що екстракти пшеничних висівок можуть бути використані як субстрат для культивування каротиноносних дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Послідовне культивування на екстракті пшеничних висівок *P. ostreatus* → *R. diobovatum* IMB Y-5023 забезпечувало збільшення виходу біомаси цих дріжджів на 40 % порівняно з екстрактом висівок без попереднього культивування *P. ostreatus*. Розроблено схему послідовного культивування *P. ostreatus* → *R. diobovatum* IMB Y-5023, яке дозволяє отримати як мінімум два цільових продукта: міцелій *P. ostreatus* і біомасу дріжджів.
- Встановлено, що на відміну від більшості інших каротинсинтезуючих організмів (таких як: водорості, бактерії, гриби, в т.ч. дріжджі), *R. diobovatum* IMB Y-5023 можуть культивуватися в темряві, світло не являється стимулюючим фактором росту і каротиногенезу цих дріжджів.
- Показано, що освітленість впливала на кількісний склад каротиноїдних пігментів і не впливала на їх якісний склад. Вперше у складі каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* IMB Y-5023 було виявлено астаксантин і показана можливість отримання лікопену, а також загальних каротиноїдів у великих кількостях у біомасі цих дріжджів - до 25 мг/г сухої маси.

- Встановлена відсутність прямої кореляції між вмістом глюкози та інших моносахаридів у середовищі культивування й накопиченням біомаси, а також показана наявність кореляції між вмістом у середовищах культивування таких олігосахаридів як три-, тетра-, пента- і гексасахаридів і вмістом каротиноїдів, зокрема, β -каротину та торулородину в біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що:

- Розроблено способи культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, що дозволяють отримати біомасу із значним вмістом каротиноїдів.
- Розроблено спосіб послідовного культивування, який дозволяє не тільки збільшити вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023, а й отримати два цільових продукта.
- Отримані результати досліджень дають змогу використання різних способів регуляції росту, синтезу каротиноїдних пігментів та їх якісного складу дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.
- Показана можливість використання різних промислових відходів у якості живильних середовищ для культивування цих дріжджів та способи їх оптимізації.
- Показано, що *R. diobovatum* IMB Y-5023 можуть бути використані як для отримання біомаси, так і для отримання каротиноїдів у біотехнологічному виробництві, з можливістю підвищення його рентабельності.

Результати роботи використовуються в освітньому процесі на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна у рамках спеціального курсу: «Об'єкти біотехнології» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загального курсу біологічного факультету Харківського

національного університету імені В. Н. Каразіна «Біотехнологія». (Акт впровадження).

Біоетична експертиза. Відповідно до результатів експертизи Комітету з питань біоетики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 4 від 26 квітня 2018 р.) дисертаційна робота Єльчіщевої Юлії Володимирівни «Розробка способів культивування каротиноносних дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023» виконана без порушень міжнародно визнаних біоетичних норм досліджень та законодавства України.

Особистий внесок здобувача. Самостійно була підібрана та проаналізована література за темою дисертації, здійснена постановка експериментів, вибір досліджуваних показників і статистична обробка частини результатів. Експерименти з визначення динаміки росту та виходу біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах, вмісту ліпідів, загального азоту, загального вуглецю в досліджуваних середовищах були проведені самостійно. Самостійно проведено роботу з підготовки зразків для визначення якісного та кількісного вмісту каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023, а також вуглеводного складу досліджуваних живильних середовищ методом вискоєфективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією, а саме: екстракцію пігментів з клітин дріжджів та мікрофільтрацію живильних середовищ (відділення від білкових молекул).

Експерименти з визначення якісного та кількісного вмісту каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023, а також вуглеводного складу досліджуваних живильних середовищ методом вискоєфективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією, а також статистична обробка деяких одержаних результатів були проведені спільно зі співробітниками відділу ферментації та біосинтезу Інституту харчових технологій рослинного походження Університету природничих наук у м. Познані (м. Познань, Польща).

Аналіз та інтерпретація отриманих результатів проведені разом з науковим керівником д.б.н., проф. Божковим А. І.

Апробація матеріалів дисертації. Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів:

X Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки» (Київ, 2012); IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013); VI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченій 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В. І. Липського (Одеса, 2013); XIV міжнародній заочній науково-практичній конференції «Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии» (Москва, 2014); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 186 сторінок, з них основного тексту 152 сторінки. Робота ілюстрована 12 таблицями та 36 рисунками. Список використаних джерел містить 180 найменувань.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика каротинсинтезуючих дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023

Життєвий цикл та морфологія. Дріжджі *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 відносять до базидіальних грибів. Ці базидіоміцетові дріжджі є аеробними організмами, що не здатні до бродіння. *R. diobovatum* мають типовий життєвий цикл для роду *Rhodosporidium* (рис.1).



Рис. 1. Життєвий цикл дріжджів роду *Rhodosporidium* [29]

Стадія анаморфи (нестатевого розмноження) *R. diobovatum* в значній мірі відповідає стандартному опису стадії анаморфи дріжджів *Rhodotorula glutinis*. Саме тому раніше довгий час дріжджі *R. diobovatum* часто плутали з *Rh. glutinis*.

Однак, після спостереження повного життєвого циклу (і статевого процесу розмноження) з чіткими морфологічними формами, що відрізняються від описаних видів *Rhodosporidium*, Newell та Hunter (1970) запропонували таку нову біноміальну номенклатуру:

Rhodosporidium diobovatum sp. n.

Зазвичай як при зростанні на рідких середовищах, так і на агаризованих середовищах клітини *R. diobovatum* мають круглу або овальну форму розміром 1.3 - 6.0 x 2.0 - 8.7 мкм [30].

Поширення в природі. У природі дріжджі *R. diobovatum* зустрічаються в гірських озерах [31], в глибинах океанів і морів [32, 33], при чому були випадки, коли вони були ізольовані з досить великої глибини гідротермальних джерел, де, як виявилось, ці дріжджі колонізували різні субстрати (креветки, мідії та губки) [34], а також в ґрунті і на рослинах [35].

Необхідно зазначити, що в більшості випадків сонячне світло є малодоступним або недоступним зовсім у вищевказаних місцях знаходження дріжджів *R. diobovatum*.

Склад клітинної біомаси. Дріжджі *R. diobovatum* у складі своєї біомаси містять білок, амінокислоти, вітаміни, ліпіди, кількість яких може варіювати в біомасі, в залежності від умов культивування [26], органічні кислоти, убіхінон і каротиноїди [36].

Здатність синтезувати каротиноїдні пігменти. Незважаючи на те, що дріжджі *R. diobovatum* часто зустрічаються в досить екстремальних умовах навколишнього середовища, де сонячне світло малодоступне, вони становлять інтерес для біотехнології тим, що здатні синтезувати такі вторинні метаболіти, як каротиноїдні пігменти.

Однак, в наш час, існує досить мало наукових праць, в яких був би досить докладно вивчений каротиногенез *R. diobovatum* [37, 25, 36]. У той же час робіт з вивчення особливостей синтезу і властивостей каротиноїдів таких дріжджів як *Rh. glutinis* (до анаморфи яких довгий час відносили *R. diobovatum*) досить багато [38, 39, 40, 41].

У своїх роботах Buzzini та ін. (2007) і Yurkov та ін. (2008) досліджували пігментний склад каротиноїдів деяких штамів *R. diobovatum*. Було показано, що основними каротиноїдними пігментами цих дріжджів є: торулін, торулородин, β-каротин, γ-каротин. Загальна кількість каротиноїдів і їх склад

сильно варіювали і залежали від штаму, а також середовища і умов культивування.

Здатність синтезувати та накопичувати ліпіди. Відомо, що дріжджі *R. diobovatum* належать також до мікроорганізмів, які здатні накопичувати у своїй біомасі більше 20% ліпідів, в залежності від середовища і умов культивування [26]. Такі мікроорганізми становлять інтерес для біотехнології як джерело олії для синтезу біодизельного палива [42].

У своїй роботі Munch зі співавторами (2015) досліджували вплив чистого гліцерину і гліцерину, отриманого з відходів виробництва біодизелю, як єдиного джерела вуглецю, на накопичення біомаси і ліпідів у ній дріжджами *R. diobovatum* 08-225. Було показано, що за культивування на таких середовищах, при обмеженні кількості азоту в них, *R. diobovatum* 08-225 накопичували до 14 г/л біомаси з вмістом ліпідів у ній до 50% від всієї клітинної маси.

Потенціал біологічного контролю дріжджів *Rh. diobovatum* (антибіотичний потенціал). Існує низка наукових праць про те, що дріжджі *R. diobovatum* мають потенціал біологічного контролю над збудниками деяких хвороб рослин. Дріжджі *R. diobovatum* забезпечують тривалий сезонний захист проти цвілевих грибів *Botrytis cinerea*, які є збудниками ризоктоніозу в помідорових теплицях [43, 44]. Дріжджі *R. diobovatum* здатні захищати томати від ризоктоніозу, тим самим збільшуючи врожай плодів порівняно з інокульованим контролем [45]. Також *R. diobovatum* зменшують довжину ділянок, вражених фітофторозом, на рослинах огірків, викликаного *Didymella bryoniae* [46].

У своїй роботі Utkhede та Koch (2004) припустили, що така антибіотична здатність *R. diobovatum* контролювати деякі патогени рослин може пояснюватися екскрецією дріжджів *R. diobovatum* у середовище лізоциму - білку, що атакує клітинну стінку деяких мікроорганізмів, таким чином вбиваючи їх [47].

Подальші дослідження цього явища можуть бути перспективними для рослинництва.

Ріст *Rh. diobovatum* у клітинних культурах. Відомо, що при зростанні культури клітин, у тому числі й в рідких живильних середовищах, спостерігається кілька фаз росту: лаг-фаза, експоненціальна фаза, стаціонарна фаза, і фаза відмирання клітин [48]. Тривалість усіх фаз росту, що відображають зміни кількості біомаси, її складу та складу культурального середовища, може сильно коливатися в залежності від властивостей мікроорганізму, складу і концентрації речовин живильного середовища, продуктів метаболізму, а також від комплексу фізико-хімічних умов культивування дріжджів.

У промисловому біотехнологічному процесі тривалість культивування мікроорганізмів впливає на рентабельність всього виробництва. Існує низка наукових робіт, в яких були досліджені особливості фаз росту і їх тривалість у різних видів каротинсинтезуючих дріжджів, таких як: *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Cystofilobasidium* [15, 49]. Водночас, існує дуже мало літературних даних про характер і тривалість росту культури дріжджів *R. diobovatum*.

Здатність *R. diobovatum* засвоювати різноманітні субстрати. Моносахариди легко засвоюються клітинами дріжджів [50]. Деякі види дріжджів здатні засвоювати і полісахариди, зокрема поліфруктозани (інулін), полігалактоуроніди (пектини), геміцелюлози (ксилан) [30]. Здатність до розщеплення β -глюкозидних зв'язків целюлози у дріжджів практично відсутня [51].

R. diobovatum здатні засвоювати такі джерела вуглецю як глюкоза, галактоза, сахароза, мальтоза, целлобіоза, трегалоза, рафіноза, інулін, ксилоза, арабіноза, d-рибоза, етанол і гліцерин [30].

Здатність клітин *R. diobovatum* до біологічного синтезу наночасток. Як відомо, морські мікроорганізми взаємодіють з іонами металів, оскільки морські екосистеми постійно піддаються забрудненню металами. Ці

мікроорганізми можуть зменшувати металеві іони або перетворювати їх у фосфати, сульфіді, карбонати.

Біосинтез наночастинок з використанням мікроорганізмів привертає до себе велику увагу в останні роки, оскільки цей шлях може призвести до синтезу монодисперсних наночастинок. Seshadri зі співавторами (2011) повідомили про внутрішньоклітинний синтез стабільних наночастинок свинцевого сульфату морськими дріжджами *R. diobovatum*. Елементарний аналіз за допомогою енергетичної дисперсійної атомної спектроскопії (EDAX) показав наявність частинок, що складаються зі свинцю та сірки, у співвідношенні 1: 2, що вказує на те, що наночастинки PbS були закриті пептидом, багатим сіркою. Кількісне вивчення поглинання свинцю за допомогою атомно-абсорбційного спектрометрії показало, що 55% свинцю у середовищі накопичується в експоненціальній фазі росту культури, тоді як ще 35% накопичуються у стаціонарній фазі; Таким чином, загальне відновлення наночастинок PbS становило 90% [33].

Невелика кількість цих наукових робіт свідчить про ще один можливий напрямок використання дріжджів *R. diobovatum* в біотехнології.

1.2 Ріст клітин у культурі

Коли клітини забезпечені необхідними поживними речовинами і важливими факторами росту, вони стають метаболічно активними і ростуть. Ріст культури відбувається в два етапи. На першому етапі клітини синтезують нові клітинні компоненти і збільшують свій розмір, на другому етапі кількість клітин в популяції збільшується. Здатність до розмноження шляхом клітинного поділу, яка збільшує популяцію, має величезне значення для мікробіологічного контролю та біотехнології [52].

Крива росту відображає зміну кількості клітин у культурі при накопичувальному культивуванні. Це показує, що культура проходить через кілька етапів. Початковий плоский період на кривій росту називається лаг-

фазою, потім слідує фаза експоненційного росту, в якій кількість життєздатних клітин збільшується в логарифмічній прогресії. Неприятливі умови навколишнього середовища пригнічують ріст, у результаті чого настає стаціонарна фаза росту. У фазі відмирання культури вичерпання поживних речовин і накопичення продуктів метаболізму призводять до підвищеної загибелі клітин [53] (рис. 2).

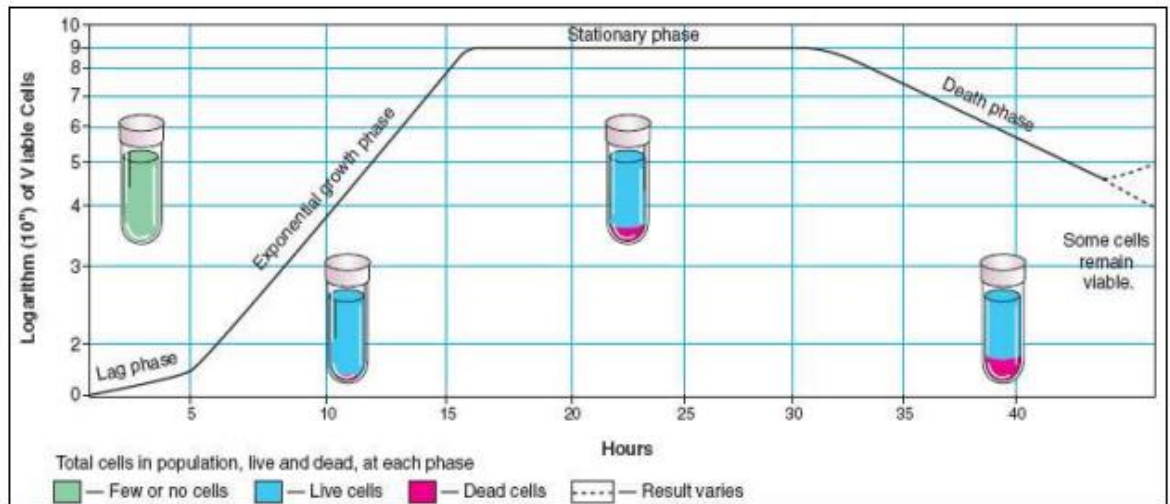


Рис. 2. Крива росту клітинних культур [53]

В процесі метаболізму утворюється безліч різних проміжних метаболітів, які регулюються на багатьох рівнях. Знання такого регулювання у дріжджів має вирішальне значення для використання фізіології дріжджових клітин в біотехнології.

Вторинний метаболізм - це закінчення метаболічних шляхів і його молекулярні продукти не є необхідними для виживання організму. Прикладом продуктів вторинного метаболізму є антибіотики та пігменти. Індукція вторинного метаболізму пов'язана з конкретними умовами навколишнього середовища або з конкретними етапами розвитку. Наприклад, при рості в багатому живильному середовищі більшість бактерій використовує практично основний обмін речовин, що забезпечує ріст і розмноження. Однак, після зменшення вмісту поживних речовин, вони починають синтезувати вторинні метаболіти [54].

1.3 Чинники, що впливають на ріст та синтез метаболітів каротинсинтезуючих дріжджів

1.3.1 Джерела живлення

Для оптимального росту і функціонування одноклітинні організми потребують певних умов середовища. Стан якого визначається хімічним складом, фізичними та біологічними факторами. Розуміння потреб дріжджів є важливим не тільки для їх успішного культивування в лабораторії, але й для оптимізації промислових ферментативних процесів [56].

Визначення елементного складу дріжджової клітини дозволило встановити поживні потреби дріжджів. Вони отримують основні необхідні елементи з середовища росту з простих джерел живлення, які повинні бути доступні на рівні макроелементів (близько 10^{-3} М) у випадку С, Н, О, N, Р, К, Mg і S або на рівні мікроелементів (близько 10^{-6} М) в разі не основних елементів.

Дріжджі хемоорганотрофні організми, оскільки вони використовують органічні сполуки як джерело вуглецю та енергії. Дріжджі можуть використовувати широке розмаїття субстратів як джерела поживних речовин. У багатьох випадках, зниження доступності одного субстрату може бути компенсовано використанням іншого [50].

Коли одна з найважливіших поживних речовин стає обмеженою або відсутньою, проліферативна функція клітини припиняється і запускається програма виживання. При відсутності однієї з основних поживних речовин, клітини дріжджів переходять в певний непроліферативний стан, відомий як стаціонарна фаза росту, кінцевою метою якого є виживання в період голодування. При наявності бідного джерела вуглецю, азотне голодування викликає утворення спор, а наявність оптимального джерела вуглецю стимулює псевдогіфальний ріст [56].

Голод є складним, хоча й загальним стресом для мікроорганізмів. Вуглець, азот, фосфор, сірка і метали – це живильні речовини, відсутність

або недостатня кількість яких, викликають голодування клітини. Навколишнє середовище для дріжджів є джерелом поживних речовин і формує простір для їх росту та метаболізму. З іншого боку, дріжджові клітини постійно піддаються впливу безлічі стресових факторів. Ці умови визначають метаболічну активність, ріст і здатність виживання дріжджів. Базові знання про вплив екологічних факторів на клітини дріжджів важливі для розуміння механізмів і адаптивної варіабельності дріжджів, а також для контролю факторів середовища з метою збільшення використання дріжджів, або припинення шкідливої дії цих факторів на мікроорганізми [57].

З метою поліпшення продуктивності синтезу каротиноїдних пігментів дріжджами, а в подальшому зниження вартості біотехнологічного процесу, були проведені різноманітні дослідження для оптимізації умов культивування, в тому числі поживних речовин і фізичних чинників. Такі фактори, як природа і концентрація джерел вуглецю та азоту, мінеральних речовин, вітамінів, рН, аерація, температура, світло і стрес значно впливають на ріст клітин і вихід каротиноїдів, тому що біосинтез каротиноїдів регулюється різними рівнями і активністю ферментів, що беруть участь в повному метаболізмі вуглецю через систему синтезу каротиноїдів. Ефективний синтез каротиноїдів також може бути досягнутий шляхом отримання гіперпродуктивних штамів за допомогою мутагенезу та генної інженерії [38].

Ефективність перетворення вихідного вуглецю в біомасу і метаболіти, а також оптимізація живильного середовища відносно його доступності та ціни є предметом інтенсивних досліджень. Велика кількість джерел, включаючи пентози і гексози, різні дисахариди, гліцерин, етанол, метанол, масла, n-алкани, або широкий спектр відходів, отриманих у результаті аграрної промисловості та сільського господарства, були розглянуті раніше й далі вивчаються у наш час в якості потенційних джерел вуглецю для біотехнологічного виробництва каротиноїдів [58, 59, 60].

Накопичення каротіноїдних пігментів у більшості дріжджів починається в кінці логарифмічної фази і триває в стаціонарній фазі (що характерно для вторинних метаболітів).

Наявність відповідного джерела вуглецю має важливе значення для синтезу каротиноїдів. Дріжджі можуть синтезувати каротиноїди за культивування на синтетичних живильних середовищах, що містять різні прості джерела вуглецю, такі як глюкоза, ксилоза, целобіоза, сахароза, гліцерин та сорбіт. Дослідження каротиногенезу привели до зростаючого інтересу, пов'язаного з використанням природних субстратів і відходів сільського господарства, харчової промисловості, в якості живильних середовищ, а саме: виноградного соку, виноградного сусла, екстракту торфу і торф'яного гідролізату, фінікового соку, гірчичного гідролізату, відходів, ізольованих з геміцеллюлозних гідролізатів [61], гідролізату відходів борошна, соку цукрової тростини, цукрових буряків, патоки, кукурудзяного сиропу, кукурудзяного гідролізату, молочної сироватки.

Останнім часом, сировина і відходи аграрної промисловості були запропоновані в якості недорогих альтернативних джерел вуглецю для мікробіологічного виробництва метаболітів (табл.1), з урахуванням також мінімізації екологічних та енергетичних витрат і проблем, пов'язаних з їх використанням [38].

Таблиця 1

**Порівняння клітинної маси і вмісту каротиноїдів дріжджів виду
Rodotorula на різних субстратах у якості джерел вуглецю**

Вид <i>Rodotorula</i>	Джерело вуглецю	Біомаса, г/л	Загальний вміст каротиноїдів, мг/г сухої біомаси	Літературне джерело
<i>Rh. gracilis</i> CFR 1 AU	Глюкоза	2,4	26.0	[58]
<i>Rh. glutinis</i> 32	Глюкоза	23,9	5,4	[62]

<i>Rh. glutinis</i> CCT 2186	Сік цукрової тростини	6,7	0,197	[63]
<i>Rh. Rubra</i>	Сік цукрової тростини	4,4	0,427	[63]
<i>Rh. Rubra</i>	Торф'яні Екстракти	4,8	1,26	[64]
<i>Rh. glutinis</i> KCTC	Меляса цукрової тростини	11,7	0,295	[65]
<i>Rh. glutinis</i> TISTR	Гідролізат відходів борошна	10,35	0,345	[66]
<i>Rh. glutinis</i> DBVPG 3853	Виноградне сусло	6,3	1,1	[67]
<i>Rh. mucilaginosa</i> CRUB 0195	Кукурудзяний сироп	10,6	0,156	[68]
<i>Rh. glutinis</i> 32	Меляса цукрової тростини	78,0	2,36	[62]
<i>Rh. mucilaginosa</i> NRRL-2502	Меляса цукрової тростини	4,2	21,2	[60]
<i>Rh. mucilaginosa</i> NRRR-2502	Сиворотка	2,4	29,2	[60]
<i>Rh. glutinis</i> DBVPG 3853+ <i>D.castellii</i> DBVPG 3503	Кукурудзяний сироп	15,3	0,535	[69]
<i>Rh. glutinis</i> 22P+ <i>L. helveticus</i> 12A	Ультрафільтрат сиворотки	30,2	0,268	[70]
<i>Rh. rubra</i> GED5+ <i>K.lactis</i> MP11	Ультрафільтрат сиворотки	24,3	0,421	[71]
<i>Rh. rubra</i> GED2+ <i>L.casei</i> Ha1	Ультрафільтрат сиворотки	27,0	0,448	[72]
<i>Rh. rubra</i> GED2+ (<i>L. bulgaricus</i> 2-11+ <i>S.thermophilus</i> 15 HA)	Ультрафільтрат сиворотки	26,0	0,503	[73]

Хімічний склад і концентрація джерел азоту в середовищі також можуть бути фізіологічним контролем і регуляторами пігментного обміну у

мікроорганізмів. Деякі неорганічні і органічні джерела азоту, а також екстракти з борошна і білковий гідролізат були досліджені для поліпшення синтезу каротиноїдів. Однак, зміна вмісту каротиноїдів в дріжджах відносно N- джерела, що використовується в середовищі, та швидкість синтезу пігментів більше залежать від продуктів катаболізму джерела азоту, ніж від прямої стимуляції азотними сполуками [74, 58].

1.3.2 Вплив рН, аерації, температури, світла на ріст і каротиногенез мікроорганізмів

Одноклітинні організми, що вільно існують в природі, такі як дріжджі, постійно стикаються з великими змінами в навколишньому середовищі. Умови навколишнього середовища, які загрожують виживанню клітини, або, принаймні, її оптимальній життєдіяльності, зазвичай називають клітинним стресом. Зміни в навколишньому середовищі можуть бути фізичної або хімічної природи: температура, радіація, концентрації розчинених речовин та води, присутність певних іонів, токсичних хімічних агентів, рН і наявність поживних речовин.

У природі дріжджовим клітинам часто доводиться стикатися одночасно з коливаннями більш ніж одного з таких факторів середовища [75]. У промисловості прояв стресу для дріжджів має важливий практичний аспект. Якщо у виробництві пива дріжджі відчували нестачу поживних речовин під час тривалого зберігання, то вони втрачають певні властивості клітинної поверхні, зокрема можливість флокуляції, наслідок перенесення несприятливих умов [55].

Каротиноносні дріжджі вважаються поширеними скрізь, оскільки вони зустрічаються в наземних, прісноводних і морських середовищах, й здатні колонізувати велику різноманітність субстратів. Вони можуть засвоювати різні джерела вуглецю, в тому числі і відходи (як дешеві середовища). Дріжджі, які синтезують каротиноїди, здатні рости в широкому діапазоні

значень рН від 2,5 до 9,5 і в широкому діапазоні температур від 5 до 26° С [59, 76]. Найбільш важливим наслідком екологічного стресу для каротиноносних дріжджів є стимулювання синтезу каротиноїдів та інших вторинних (як і первинних) метаболітів.

Були описані зміни синтезу ергостерину, вмісту ліпідів, гліцерину та трегалози, а також структури мембран у відповідь на стрес [75].

Накопичення каротиноїдних пігментів у більшості дріжджів починається в кінці логарифмічної фази і триває в стаціонарній фазі росту та сильно варіює. Синтез каротиноїдів залежить від відмінностей між штамами одного виду і знаходиться під сильним впливом умов культивування (табл. 1).

Наявність стресових факторів під час культивування призводило до змін росту відповідно до виду дріжджів та типу діючого чинника або фази росту культури [77].

Як відомо, у багатьох організмів каротиногенез регулюється рівнем освітленості. Однак, інтенсивність і режим освітленості варіює залежно від мікроорганізму. Температура є ще одним важливим фактором, що впливає на ріст клітин і утворення метаболітів. Вплив температури залежить від видової специфічності мікроорганізму і часто проявляється в варіації кількості синтезованих каротиноїдів. Було встановлено, що більш низькі температури (25° С), сприяють синтезу β-каротину та торуліну, в той час як більш високі температури (35° С) позитивно впливали на синтез торулородину в *Rh. glutinis* [38]. Ефект аерації на каротиногенез залежить від виду мікроорганізму. Аерація впливає не тільки на кількість каротиноїдів, а й на склад окремих пігментів, що входять до складу каротиноїдів [73]. При інтенсивній аерації, концентрація каротиноїдів збільшується порівняно з біомасою і жирними кислотами *Rh. glutinis*, але склад каротиноїдів (торулін > β-каротин > γ-каротин > торулородин) залишався незмінним.

На відміну від цього, *Sporobolomyces roseus* реагує на збільшення аерації шляхом переходу від переважного β-каротину в торулін і

торулородин [24]. Інші індуктори окисного стресу, такі як опромінення та генератори вільних радикалів, чинять істотний вплив на синтез каротиноїдів. Після УФ опромінення рожевих дріжджів *Rh. glutinis* був отриманий мутант 32 жовтого кольору, який синтезував у 24 рази більше загальних каротиноїдів (2,9 мг/г сухої біомаси) і в 120 разів більше β -каротину, ніж у дикого штаму, за більш короткий час [62]. Синтез каротиноїдів у *Rh. glutinis* при зростанні клітин в умовах окисного стресу був у 5-6 разів вище, ніж у дикого типу [77, 78].

Показано, що якщо одного разу клітини мікроорганізмів зазнали легкий стрес, то вони проявляють стійкість до сильного стресу - це явище називають гормезісним ефектом. Було показано, що вплив одного типу стресу призводить до толерантності відносно інших типів стресу (перехресний захист) [75]. Коли клітини піддані впливу стресових факторів в навколишньому середовищі, їх відповідь на стрес формується змінами в експресії сотень або тисячі генів, виявляючи пластичність геномної експресії [79].

Деякі з цих змін експресії генів є специфічними для кожного нового середовища, в той час як інші представляють загальну відповідь на екологічний стрес. Порівняльний аналіз відповідей геномної експресії, на різноманітні зміни в навколишньому середовищі, показав, що експресія приблизно 900 генів (близько 14% від загальної кількості генів дріжджів) є стереотипною зміною, що слідує після стресових екологічних переходів. Функції продуктів, синтезованих у результаті експресії цих генів, - захист критично важливих систем метаболізму, таких як енергетичні запаси, баланс внутрішньої осмолярності і окислювально-відновного потенціалу, цілісність клітинних структур. Захист цих особливостей продуктами стресових генів, швидше за все, вносить свій внесок в перехресну стійкість дріжджових клітин на повторювані різноманітні стреси, при яких клітини піддавалися невеликій дозі одного стресу, стали толерантними до летальної дози наступних стресових умов [75, 56, 79].

Однією з найважливіших умов виживання клітин є підтримка життєво необхідного джерела енергії. Глюкоза є кращим джерелом вуглецю для дріжджів, і у відповідь на стрес, в клітині стимулюються різні гени, які впливають на метаболізм глюкози. Це включає в себе гени, які кодують переносники глюкози, що служать для імпортування зовнішньої глюкози в клітини і глюко-кінази, які активують цукор для подальшого катаболізму. У відповідь на стреси навколишнього середовища, глюкоза може залучатися до синтезу трегалози, накопичення глікогену, синтезу АТФ через гліколіз, і регенерації NADPH через пентозофосфатний шлях [75].

1.4 Метаболізм каротиноїдів дріжджів

1.4.1 Різноманітність і поширення каротиноїдів у природі

Каротиноїди від латинського *carota* - «морква» і *eides* - «вид», що означає пігменти, які обумовлюють вид моркви. Це природні пігменти жовтого або оранжевого кольору. Жовто-помаранчеве забарвлення квітів, рослин і комах обумовлюється наявністю в них каротиноїдів.

В даний час описано понад 700 різноманітних структур, які можуть бути віднесені до каротиноїдів [80, 81, 18].

Така велика різноманітність каротиноїдів пояснюється тим, що лінійний полімер СН груп може мати різну довжину, різну кількість подвійних зв'язків і велику різноманітність хімічних модифікацій кінцевих ділянок. Крім цього, модифікація лінійного ланцюга каротиноїдів завдяки дії циклаз, гідролаз, кетолаз призводить до утворення широкого спектру різноманітності каротиноїдів (рис.3).

За частотою зустрічаємості усі каротиноїди можуть бути умовно поділені на 3 групи: ті, що часто зустрічаються в різних систематичних групах організмів, до них можна віднести лікопен, лютеїн, β -каротин, віолоксантин, астаксантин та інші; ті, що рідко зустрічаються або зустрічаються тільки в окремих представників бактерій, рослин або грибів,

такі як торулін; унікальні або екзотичні каротиноїди, які виявлені в окремих видів організмів, такі як стафілоксантин (C₃₀) (рис.3), який був виявлений в клітинах *Staphylococcus aureus* і у декількох інших видів [82], а також декапреноксантин (C₅₀) в клітинах *Corynebacterium glutanicum* [83, 84].

Кількість і склад каротиноїдів залежать не тільки від видового складу досліджуваних представників, але й від умов росту в природному або культуральному середовищі [85, 15].

Аналіз складу та вмісту каротиноїдів у представників різних систематичних груп показав, що вони зустрічаються у бактеріях, ціанобактеріях, мікроводоростях, грибах, рослинах, за винятком тварин та людини.

При цьому вони надходять в організм тварин та людей з їжею і виконують важливі функції – утворення вітаміну А та інших біологічно активних сполук [10].

Отже: 1 - каротиноїди дуже різноманітні, що визначається довжиною вуглецевого каркасу, кількістю подвійних зв'язків і різноманітністю хімічних модифікацій; 2 - каротиноїди дуже широко поширені в органічному світі і можуть синтезуватися у всіх організмів, крім тварин; 3 - виконують різноманітні функції й навіть в клітинах тварин, куди вони надходять з їжею; 4 - вміст каротиноїдів в одних і тих же організмах може сильно варіювати в зв'язку з умовами середовища і стадіями розвитку; 5 - каротиноїди можуть синтезуватися в організмі різними метаболічними шляхами і не є життєво необхідними, вони відносяться до вторинних метаболітів.

Дослідження розповсюдженості, еволюційної різноманітності, онтогенетичних змін і їх функціональної ролі дозволяє припустити, що це може бути демонстрацією наявності різноманітних стратегій еволюційних і онтогенетичних рішень проблем виживання органічних форм.

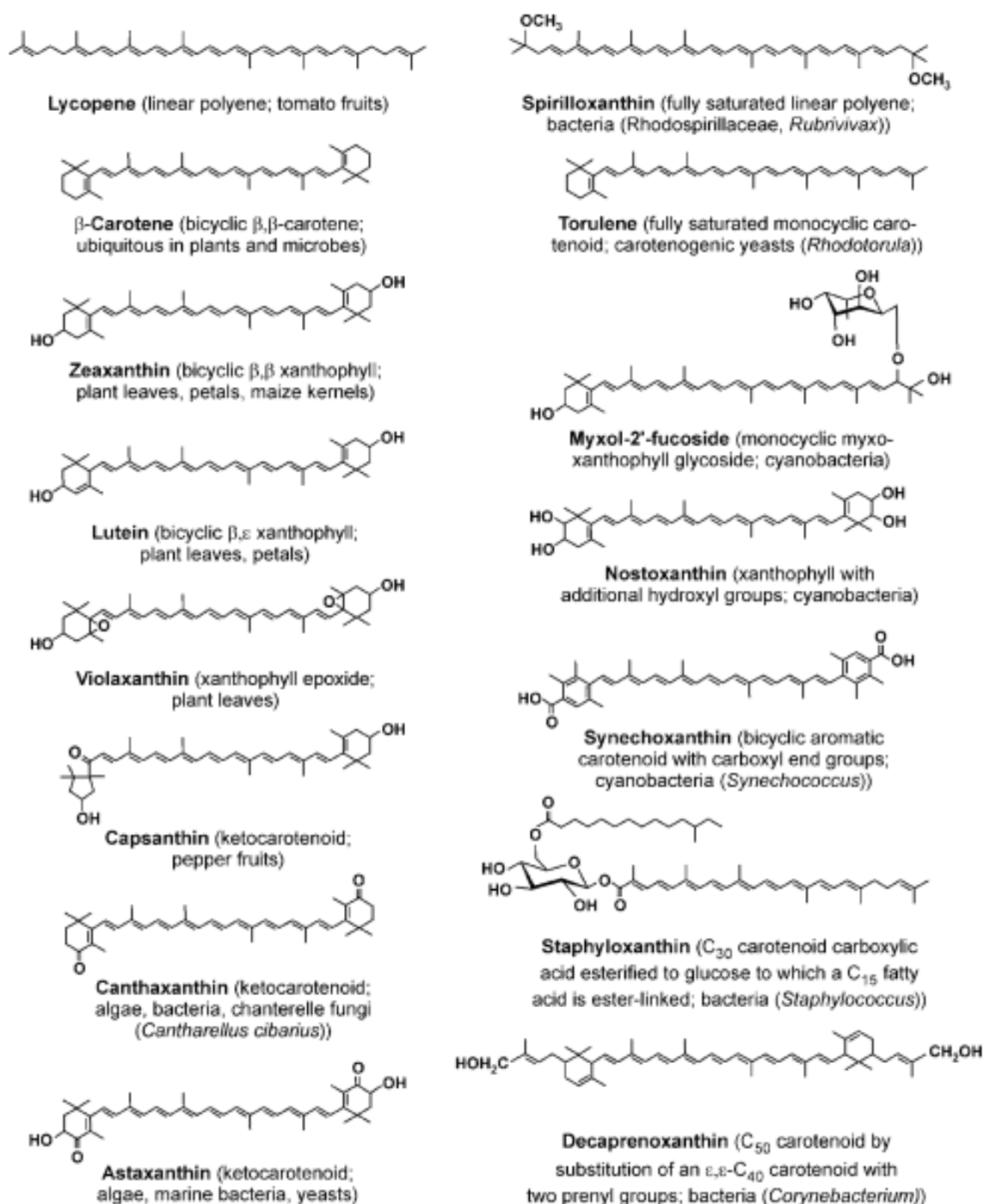


Рис. 3. Структурна різноманітність деяких каротиноїдів, вибраних з різних організмів [7]

1.4.2 Загальна характеристика каротиноїдів

Каротиноїди є підгрупою ізопреноїдних сполук [81, 18]. Переважна більшість каротиноїдів походять з лінійного тетратерпену фітоєну (C_{40}), але C_{30} і C_{50} каротиноїди також можуть бути отримані в результаті синтезу

деякими бактеріями через різні проміжні продукти. Пігментний характер каротиноїдів, для яких він найбільш відомий, передається у вигляді безбарвної базальної C_{40} структури фітоену шляхом введення додаткових подвійних зв'язків. Кілька етапів десатурації призводять до утворення пігменту червоного забарвлення лікопену (11 подвійних зв'язків), який надає колір зрілим плодам томатів. Додаткове знебарвлення повністю до 15 подвійного зв'язку було досягнуто штучно в результаті методу молекулярного розведення, в рожевому 3, 4, 3', 4'-тетрадегідро-лікопені [86, 87]. Ряд модифікацій лінійного ланцюга за допомогою циклази, гідроксилази, кетолази і інших ферментів породжує широкий спектр різноманітності каротиноїдів. Деякі основні структурні принципи і кілька екзотичних структур показано на рисунку 3.

Найбільш широко розповсюджені каротиноїди містять дві термінальні кільцеві системи приєднані за допомогою пов'язаних подвійних зв'язків хромофора несучого ланцюга. Вони включають прості вуглеводневі каротини (β , β -каротин, спрощений термін β -каротин), ксантофіли, гідроксильовані на кінцевих кільцях (наприклад, зеаксантин, лютеїн). Кисень також може бути включений в формі кето-групи, з або без додаткових гідроксильних груп (астаксантин і кантаксантин). Ароматичні кільця не часто зустрічаються в каротиноїдах, але вони іноді зустрічаються в деяких морських губках, мікобактеріях і ціанобактеріях [88, 89].

Аналогічно, моноциклічні каротиноїди такі як торулін зустрічаються дуже рідко. Вони були виявлені в каротиноносних дріжджах видів *Rhodotorula* і *Phaffia* [38].

Деякі бактерії синтезують короткі каротиноїди C_{30} з попередника C_{15} фарнезил дифосфата або синтезують подовжені C_{45} і C_{50} каротиноїди. Прикладами таких екзотичних каротиноїдів є стафілоксантин (C_{30}), який був визначений у *S. aureus* і у декількох інших видів [82], а також декапреноксантин (C_{50}) із *C. glutanicum* [83] (рис. 3).

Каротиноїди вперше з'явилися у примітивних організмах, ймовірно, як ліпідні молекули, щоб зміцнити мембрани за допомогою їх жорсткого кон'югованого подвійного зв'язку.

Каротиноїди виконують безліч функцій. Каротиноїдні молекули поглинають світло в діапазоні 450-570 нм, в проміжку поглинання хлорофілу. Отже, каротиноїди можуть виконувати функції допоміжних пігментів у фотосинтезі, збільшуючи збір (поглинання) світла. Крім того, їх фотозахисні властивості обумовлені особливою організацією збуджених синглетних і триплетних орбіталей низьких енергій. Ступінь сполучення подвійного зв'язку впливає на хромофор і, таким чином на колір, а також змінює світлозбираючі, фотозахисні і фоточутливі властивості. Було запропоновано, що 9-11 подвійних зв'язків можуть бути оптимальними для світлозбираючої (світлопоглинаючої) функції [90].

Усі хлорофототрофи, в тому числі деякі еубактерії, водорості і вищі рослини, які використовують бактеріохлорофіл і/або хлорофіл для поглинання світла, синтезують високий рівень каротиноїдів. Фототрофність також може залежати від апокаротиноїду ретиналю (C_{20}), який утворюється шляхом розщеплення молекули β -каротину або інших каротиноїдів у різних організмах, що синтезують каротиноїди, таких як деякі протеобактерії, археї і навіть гриби [89].

Однак, у всіх організмів, найбільш важливі загальні функції каротиноїдів можуть бути пов'язані з їх фотопротекторними та антиоксидантними властивостями.

У тварин, наявність каротиноїдів пояснює велику кількість яскравих кольорів ссавців, птахів, риб, ракоподібних, мух і метеликів. Ці організми, включаючи людину, не можуть синтезувати каротиноїди, але повинні отримувати їх зі свого раціону. У деяких випадках вони також можуть бути отримані від симбіотичних або патогенних мікроорганізмів. Цікаво, що перше виключення з цієї парадигми було виявлено нещодавно. Аналіз секвенованого геному горохової попелиці *Acyrtosiphon pisum* привів до

відкриття ендегенного кластеру генів біосинтезу каротиноїдів, який, мабуть, був введений в геном тлі за допомогою горизонтального переносу генів з патогенного гриба [91].

Ця зміна призводить до припинення формування торуліну, який відповідає за червоний колір тіла. В наш час гарно описані функції каротиноїдів, які вони виконують в організмі людини і їх користь для здоров'я [10]. Ці функції включають їх головну роль як антиоксидантів, властивість β -каротину як провітаміну А, також роль каротиноїдів в запобіганні дегенерації жовтої плями ока та інші.

1.4.3 Вміст каротиноїдів у клітинах дріжджів різних видів

Дріжджі, які здатні синтезувати каротиноїдні пігменти, становлять інтерес з біотехнологічної точки зору. Серед великої різноманітності таких дріжджів, представники лише кількох невеликих таксономічних груп були досліджені на вміст каротиноїдів [36]. Найвідомішими продуцентами цих пігментів є: *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), *Rhodotorula* (порядок *Sporidiobolales*) [70, 92], *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* [25], також існують деякі дані про кількість і склад каротиноїдних пігментів у представників родів *Cryptococcus* (*Tremellales*) [93, 36], *Cystofilobasidium* [68], *Dioszegia* [94], *Kockovaella* [15].

У дріжджів *Phaffia rhodozyma* основним каротиноїдним пігментом є атаксантин [15, 23]. Дріжджі роду *Rhodotorula* добре відомі як продуценти торуліну, торулородину, β -каротину і γ -каротину [25, 95, 15]. Ще одними відомими продуцентами цих же чотирьох пігментів є дріжджі *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* [25]. Було виявлено, що дріжджі *Cystofilobasidium* і *Dioszegia* синтезують три основних пігменти - торулородин, торулін і β -каротин [15]. Дріжджі роду *Rhodospiridium* як і роду *Rhodotorula* в основному відомі як продуценти торуліну, торулородину, β -каротину і γ -каротину [25, 36]. Але даних про кількість каротиноїдів і їх

склад у біомасі цих дріжджів набагато менше, ніж у дріжджів роду *Rhodotorula*. Таким чином каротиноносні дріжджі роду *Rhodospiridium* є менш дослідженими, порівняно з родом *Rhodotorula*, можливо, це пов'язано з тим, що раніше їх відносили до роду *Rhodotorula* оскільки анаморфна стадія їх життєвого циклу дуже схожа з такою у *Rhodotorula glutinis*, а статеве розмноження має свої особливості [30].

Таким чином, найпоширенішими пігментами, які синтезують різні каротиноїдні дріжджі, є β -каротин, γ -каротин, торулін, торулородин, атаксантин [96].

1.4.4 Функції каротиноїдів у клітинах дріжджів

У грибів фундаментальна функція каротиноїдів - забезпечення захисту від активного кисню видів РВК (реактивні види кисню), особливо O_2 . Крім цього, вони забезпечують непрямий захист від сонячного (ультрафіолетового) світла УФ (315-400 нм) і видимого світла (фотосинтетично активної радіації, ФАР 400-700 нм) за допомогою гасіння РВК [97].

Як відомо, деякі види дріжджів, накопичують каротиноїдні пігменти як вторинні метаболіти. У цих мікроорганізмах, синтез каротиноїдів пов'язаний з ростом [97]. Максимальне накопичення каротиноїдів спостерігається в стаціонарній фазі росту культури в зв'язку зі старінням клітин, і, ймовірно, це загальний механізм захисту від окисного стресу [98, 62, 99]. Наявність відповідного джерела вуглецю є важливою для біосинтезу каротиноїдів.

Синтез торулородину, торуліну та β -каротину є загальним для деяких родів *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium* [100]. У цих мікроорганізмах, каротиноїди можуть сприяти збереженню життєздатності старіючих клітин гасінням кисневих радикалів, можливо, компенсувати відсутність їх антиоксидантних ферментів [101]. Синтез фотозахисних сполук є загальною відповіддю деяких організмів на вплив високим

опроміненню, однак, є кілька повідомлень про фотозахист каротиноїдами клітин мікроорганізмів в цілому [102] і дріжджів зокрема [103, 104].

1.4.5 Поглинання світла і фотохімічні властивості каротиноїдів

Поглинання енергії світла органічними молекулами переводить їх в високоенергетичний збуджений стан. У випадку каротиноїдів це $\pi \rightarrow \pi^*$ перехід, в якому один з π -електронів подвійного зв'язку транслюціюється на π орбіталь більш високої енергії. π -електрони сильно делокалізовані і в збудженому стані їх енергія відносно мала, так що енергія, необхідна для переходу в стан збудження відносно невелика і відповідає енергії фотонів видимого діапазону в області 400-500 нм. Таким чином, каротиноїди мають жовтий, помаранчевий або червоний колір. Зв'язок між структурою хромофора і спектром його поглинання широко використовується для ідентифікації каротиноїдів.

Але здатність мати забарвлення не є єдиною функцією каротиноїдів. Вони мають певні фотохімічні властивості, які є основою для виконання більш важливих функцій. Унікальні фотохімічні властивості цих сполук полягають в особливій організації збуджених синглетних і триплетних орбіталей низьких енергій. Характерне для них високе поглинання світла видимого діапазону, як вважається, забезпечується сильно розширеним переходом зі стану S_0 в інший синглетний збуджений стан S_2 .

Енергетичні рівні цього збудженого стану (і стану S_1 , в яке молекула може переходити в результаті внутрішньої конверсії), розташовані вище, ніж у молекул хлорофілу, так що в такій системі може відбуватися синглет-синглетне перенесення енергії зі збуджених молекул каротиноїдів у результаті чого молекули хлорофілу будуть збуджуватися до стану S_1 , що грає ключову роль в процесі фотосинтезу.

Пряме формування триплетного стану (T_1) зі збудженого синглетного (S_1 і S_2) є малоімовірним. Але його формування за допомогою процесу

перенесення енергії з інших молекул у триплетному стані може бути дуже ефективним. Причому таке перенесення з хлорофілу та інших порфіринів на каротиноїди відбувається набагато швидше, ніж альтернативне перенесення енергії на кисень, який призводить до утворення синглетного кисню, високореакційної сполуки, здатної до пошкодження клітини. Також каротиноїди можуть бути акцепторами збудженого стану кисню, якщо такий буде сформований. Триплетний стан каротиноїдів має настільки низьку енергію, що ці молекули не здатні генерувати вільні радикали і енергія їх збудженого стану просто розсіюється у вигляді тепла. Саме вище описані властивості каротиноїдів дозволяють їм брати участь в захисті комплексів реакційного центру фотосинтезу від комбінованого впливу світла і синглетного кисню, а також сприятиме ефективній терапії пацієнтів, у яких спостерігається акумуляція вільних порфіринів в шкірі (еритропоетична протопорфірія).

Для того щоб таке перенесення енергії було високоефективним, необхідно щоб молекули перебували на близькій відстані і були орієнтовані певним чином одна щодо одної, наприклад, за допомогою з'єднуючих їх білків [105].

1.4.6 Особливості синтезу каротиноїдів у грибів

Грибні каротиноїди були досліджені у типів Ascomycota (наприклад *Neurospora crassa* і *Gibberella/Fusarium*), Basidiomycota (наприклад *Xanthophyllomyces dendrorhous* (раніше *Phaffia rhodozyma*) та *Cantharellus cibarius*) і Zygomycota, які більше не утворюють окремих підрозділів (наприклад *Phycomyces blakesleeanus*; *Blakeslea trispora*; *Mucor sp.*) [106]. *N. crassa* і *Fusarium fujikoroii* синтезують C₃₅ каротиноїд, пігмент помаранчевого кольору (неуроспороксантин), який утворюється шляхом розщеплення моноциклічного попередника торуліну C₄₀. Існує також утворення проміжної сполуки ретиналю шляхом розщеплення β-каротину.

Гриби утворюють відмінні від інших організмів продукти розщеплення каротиноїдів (наприклад, похідні триспорової кислоти). Разом із залученням їх прекурсорів C_5 від мевалонатного шляху, гриби мають дві інші важливі особливості в синтезі їх каротиноїдів. Перша особливість - це єдиний ген десатурази (CarB), що, ймовірно, відповідає за всі реакції десатурації, які вони поділяють з бактеріями. Точкова мутація в гені CarB жовтого мутанту SF21 викликає погіршення п'ятої десатурації γ -каротину до торуліну, що призводить до накопичення γ -каротину і β -каротину за рахунок неуроспороксантину і його торулін – попередників. [107]. Порядок реакцій по відношенню до неуроспороксантину відрізняється у *F. fujikuroi* порівняно з *N. crassa*, тим, що у *N. crassa* реакція циклізації відбувається після п'ятої реакції десатурації, а у *F. fujikuroi* вона відбувається до цього [108]. Друга унікальна особливість синтезу каротиноїдів у грибів полягає в комбінації ферментативних функцій фітоен-синтази та послідовних циклізацій декількох субстратів (ациклічного неуроспоріну, моноциклічного γ -каротину) в одному ферменті (CarRA, CrtYB) [85]. Існує два різних домени в гені CarRA (R для циклізацій і A для функції фітоенсинтази). Таким чином, сім ферментативних функцій, комбіновані тільки в двох структурних генах. Ймовірно, інший біфункціональний фермент виконує функцію гідролази/кетоксилази, необхідної для синтезу астаксантину, кодованого CrtS. Однак, недавній комплексний аналіз і дослідження експресії у *Mucor circinelloides* підтверджують для ексклюзивної гідроксилази β -каротину функції ферменту, що кодується в CrtS [109]. Дріжджі роду *Rhodotorula* синтезують різний спектр каротиноїдів з потенціалом комерційного використання, в основному він складається з β -каротину, торуліну та торулородину [38].

1.4.7 Можливі шляхи біосинтезу каротиноїдів

Біосинтез каротиноїдів залежить від наявності будівельних блоків C_5 ізопентеніл дифосфата (IPP)/діметилаліл дифосфату (DMAPP) через шлях метилеритритол 4-фосфату (MEP) практично у всіх фотосинтезуючих організмів (крім еугленових водоростей) [110]. Археї, деякі бактерії і гриби, які не мають шляху MEP, використовують мевалонатний (MVA) шлях для синтезу прекурсорів C_5 для утворення каротиноїдів [7].

У 1964 році Сімпсон зі співавторами [100], а пізніше Гудвін [111, 112] розглянули спільні шляхи для синтезу каротиноїдів у дріжджів і зробили висновок, що шляхи біосинтезу каротиноїдів, зазвичай складаються з 3 етапів:

1) перетворення ацетил-КоА в 3-гідрокси-3-метил-глутарил-КоА А (HMG-CoA), що каталізується HMG-CoA-синтазою. HMG-CoA потім перетворюється в сполуку C_6 , мевалонову кислоту (MVA), яка є першим специфічним попередником терпеноїдного біосинтетичного шляху. Мевалонтова кислота додатково перетворюється в ізопентеніл пірофосфат (IPP) серією реакцій, що включає в себе фосфорилювання кінази мевалонтової кислоти з подальшим декарбоксилюванням;

2) ізопентеніл пірофосфат (IPP) ізомеризується в диметилаліл пірофосфат (DMAPP) з послідовним додаванням трьох молекул IPP до DMAPP. Ці реакції каталізуються преніл трансферазою, з утворенням сполуки C_{20} гераніл гераніл пірофосфату (GGPP). Конденсація двох молекул GGPP призводить до утворення фітоєну (перший каротин C_{40} в біосинтетичному шляху), який піддається десатурації для формування лікопіну;

3) оскільки лікопін є повністю транс сполукою, ізомеризація першого або другого подвійного зв'язку фітоєну повинна відбуватися на тій же стадії в процесі десатурації [112]. Лікопін є попередником циклічних каротиноїдів і піддається цілому ряду метаболічних реакцій (наприклад, циклізації) до

утворення β -каротину, γ -каротину, торуліну, торулородину й атаксантину. γ -каротин є основною точкою розгалуження і є попередником для β -каротину і торуліну. Гідроксилювання і окислення торуліну за допомогою змішаної функції оксидази призводить до утворення торулородину. У 1976 році, Andrewes зі співавторами [113] запропонували першу схему для біосинтезу атаксантину, що веде до утворення атаксантину через багато реакцій і проміжних сполук (попередників), включаючи лікопін, β -каротин, ехіненон. Пізніше були виявлені інші проміжні сполуки, в тому числі β -зеакаротин [114], 3,3'-дигідрокси- β , γ -каротин 4,4'-діон (DCD) і торулін [115], які вказували альтернативний шлях утворення транс атаксантину за наступною схемою: β -зеакаротин \rightarrow торулін \rightarrow 3-гідрокси-3',4'-дидегідро- β -каротин-4-он (HDCO) \rightarrow DCD. Схема шляхів синтезу каротиноїдів у дріжджів показана на рисунку 4.

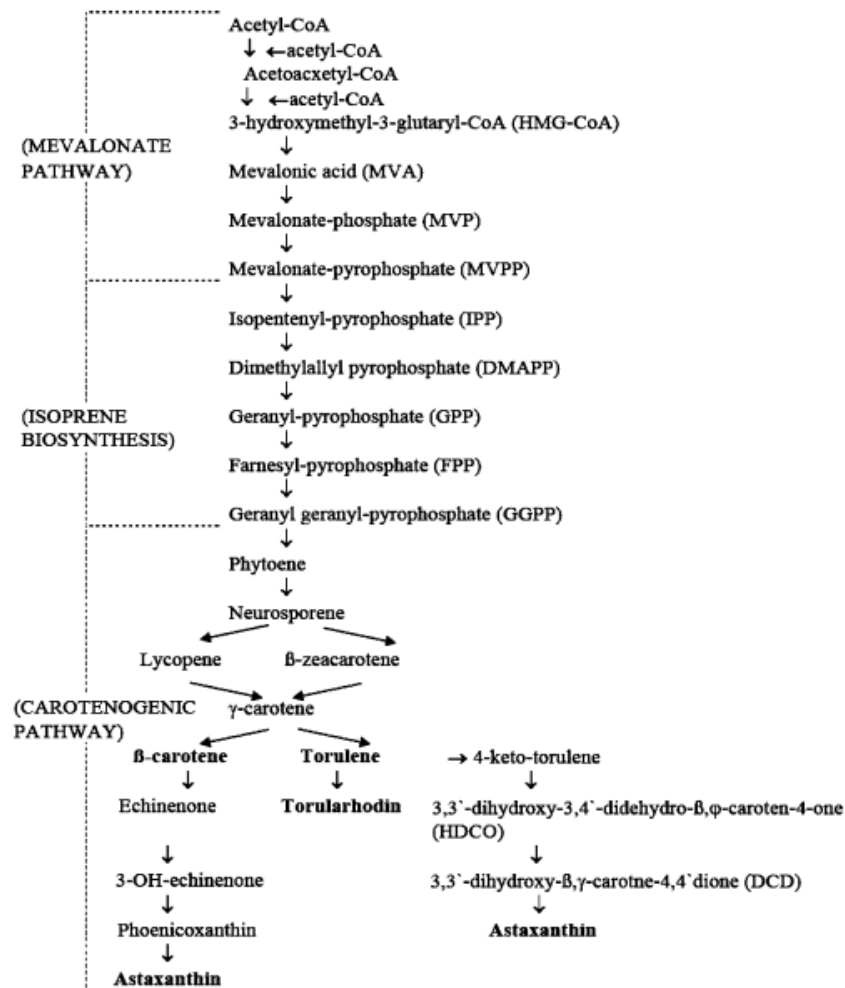


Рис. 4. Схема шляхів синтезу каротиноїдів у дріжджів [38]

1.4.8 Розщеплення каротиноїдів

Деградація каротиноїдів може відбуватися за допомогою неспецифічних механізмів таких як (фото) хімічне окислення або окислення неспецифічними ферментами, включаючи ліпоксигенази і пероксидази, але механізми цих процесів все ще погано вивчені [116]. Специфічне розщеплення каротиноїдів пов'язано з ферментативною дією групи окислювальних ферментів, що розщеплюють певні подвійні зв'язки.

Продуктами цих реакцій є апокаротеноїди, які мають певну структуру в різних організмах. Вони мають багато біологічних функцій, деякі з них мають важливе значення для метаболізму рослин, інші - важливі для екології.

Механізм специфічного ферментативного розщеплення каротиноїдів і утворення його продуктів у різних організмів (мікроорганізмів, рослин, грибів і тварин) має свої особливості, які полягають у відмінності ферментів, що беруть участь у цьому процесі, і в утворенні різних продуктів розщеплення [7]. Загальна схема специфічного ферментативного розщеплення каротиноїдів у грибів зображена на малюнку 5 [117]:

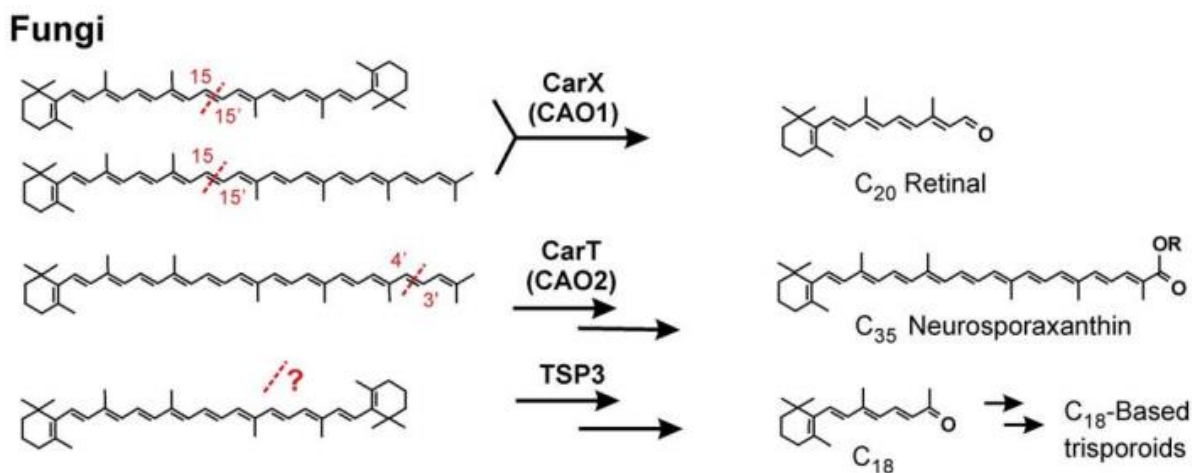


Рис. 5. Специфічне ферментативне розщеплення каротиноїдів у грибів за допомогою оксигеназ. Сайти розщеплення позначені червоними пунктирними лініями [117]

Одним з продуктів розщеплення каротиноїдів у грибів є апокаротиноїд ретиналь. Його роль у грибів все ще залишається невідомою, в той же час функції ретиноїдів були широко досліджені у тварин.

1.4.9 Регуляція каротиногенезу

Вміст каротиноїдів у клітинах дріжджів залежить від процесів їх синтезу та деградації. В свою чергу ці процеси контролюються на рівні регуляції транскрипції. Вище було зазначено, що другою унікальною особливістю синтезу каротиноїдів у грибів є комбінація ферментативних функцій фітоен синтази і послідовних циклізацій декількох субстратів (ациклічного неуроспоріну, моноциклічного γ -каротину) в одному ферменті (CarRA, CrtYB). Існує два різних домени в гені CarRA (R для циклізацій і A для фітоенсинтазної функції). Таким чином, сім ферментативних функцій, комбіновані тільки в двох структурних генах. Інtron 1381 bp між CarRA і сусіднім геном CarB містить у кластері регуляторні послідовності, які є посередниками стимуляції експресії гена за допомогою світла, статевого процесу, ретинолу та інших зовнішніх факторів [85]. Другий кластер генів (CarC, CarD, CarS, CarI) містить регуляторні гени, дерегулювання яких може викликати великі зміни як в кількості так і в складі різних каротиноїдів [118].

1.5 Основні проблеми біотехнологічного процесу

Серед дріжджів відомі різні продуценти каротиноїдів, що відрізняються як за рівнем накопичення і складом пігментного комплексу, так і за умовами культивування та за видами сировини, що використовують.

Штам дріжджів *Rhodotorula glutinis* 214 (SU 531844) культивують на мінеральному середовищі з використанням вуглеводнів нафти (1,0-1,5 об.%) або вуглеводів (2-4 об.%) як джерел вуглецю. При цьому питома продуктивність дріжджів по каротиноїдам становить близько 800 мкг/г сухої

біомаси на середовищі з вуглеводнями нафти і близько 980 мкг/г сухої біомаси на вуглеводному середовищі. Недоліком даного штаму є невисокий рівень накопичення каротиноїдів [119].

Недоліками деяких інших штамів є невисокий рівень накопичення каротиноїдів і велика тривалість процесу культивування.

В технологіях виробництва каротиноїдів існують певні проблеми. Наприклад, хімічний синтез може несприятливо впливати на споживачів з точки зору безпеки. Аналогічно для екстракції з натуральних продуктів потрібні високі виробничі витрати. Одне з обмежень, що впливає на промислове використання таких дріжджів є ускладнене засвоєння каротиноїдів, в зв'язку з особливостями структурної організації клітинної стінки дріжджів. В їх клітинах міститься багато інших біологічно активних сполук (білків, ненасичених жирів, вітамінів та ін.). У зв'язку з цим, кращою стратегією є використання повністю всієї клітинної біомаси дріжджів.

Біотехнологічна промисловість розробляє різні способи отримання необхідних речовин з клітин дріжджів: за допомогою оптимізації умов сушки, механічної деструкції, мікрохвильової обробки та обробки ферментами [15]. Також все ще залишається не вирішеною проблема, пов'язана з регулюванням процесів росту і каротиногенезу дріжджів в промислових обсягах, підбором і оптимізацією живильних середовищ та продуцентів для зменшення виробничих витрат і вартості одержуваних продуктів.

Висновки до розділу 1:

1. Каротиноїди синтезуються в клітинах бактерій, мікроводоростей, грибів та вищих рослин. Інтенсивність синтезу і розпаду каротиноїдів залежить від біології виду, стадій розвитку й умов культивування.

2. Каротиноїди проявляють антиоксидантні властивості, є попередниками жиророзчинних вітамінів у клітинах тварин, беруть участь у процесі

фотосинтезу в рослинах і їх отримання становить великий науковий і комерційний інтерес.

3. Сучасних технологій отримання каротиноїдів в Україні мало і їх розробка є актуальною.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об'єкти дослідження

2.1.1 Дріжджі *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y- 5023

Об'єктом дослідження був штам базидіоміцетових дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y- 5023 з Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Заболотного НАН України. Даний штам належить до класу Urediniomycetes, порядку Sporidiobolales, роду *Rhodosporidium*. Раніше їх визначали як анаморфу видів *Rhodotorula glutinis*. *R. diobovatum* мають типовий життєвий цикл роду *Rhodosporidium*, який складається зі стадій безстатевого (анаморфна дріжджова стадія) і статевого розмноження. Досліджуваний штам дріжджів зустрічається в різних місцях навколишнього середовища: в морських водах [33], в ґрунті і на рослинах [35]. Клітини круглої і овальної форми (1.3 - 6.0 x 2.0 - 8.7 мкм), здатні засвоювати різні джерела вуглецю [30]. *R. diobovatum* здатні синтезувати і накопичувати каротиноїдні пігменти [25]. Культивувати даний штам дріжджів можна методом поверхневого культивування (на твердих агарових середовищах) і методом глибинного культивування (в рідких живильних середовищах).

2.1.2 Дріжджі *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626

Дріжджі *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 (= *P. rhodozyma* ATCC 24202 та CBS 5905) з Німецької колекції мікроорганізмів і клітинних культур, що здатні до синтезу каротиноїдних пігментів, головним чином атаксантину [120].

Дріжджі *Xanthophyllomyces dendrorhous* відносять до типу базидіоміцетових, класу Базидіоміцети, Порядку Агарикальні, родини Tremellomycetidae, роду *Xanthophyllomyces*.

2.1.3 Базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus* НК-35

Базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus* (JACQ.) P. Kummer (плеврот черепичастий), штаму НК-35 з колекції культур вищих базидіоміцетів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Належить до класу Agaricomycetes, підкласу Agaricomycetidae, порядку Agaricales, сімейства Pleurotaceae. Придатний для інтенсивного культивування протягом року незалежно від сезону. Дереворуйнівний гриб-сапрофіт (ксилофіт) з гетероталічним типом життєвого циклу (двофакторний або тетраполярний гетероталізм), широко поширений у лісах помірної зони. Росте групами, рідше - поодинокі, на пнях, хмизі, сухому або живому, на ослаблених деревах. Є їстівним грибом. Міцелій *P. ostreatus* утворює вегетативні гіфи, ширина яких коливається в межах 1-15 мкм. По всій довжині гіфи зберігають більш-менш постійний діаметр. Розростаючись, вони утворюють триметричне розгалуження. Базидіоспори, проростаючи, дають початок первинному гомокаріотичному міцелію (без пряжок). Зустріч двох таких міцеліїв, гетероалельних по обом МАТ-факторам (локусам типу спарювання), призводить до плазмогамії й утворення дикаріотичного міцелію. На дикаріотичному міцелії відбувається утворення плодових тіл [121].

Культура *P. ostreatus*, що росте на рідких середовищах досягає стаціонарної фази росту на 12-13 добу.

P. ostreatus синтезує фенолоокислюючі ферменти лаккази [122], тирозинази та пероксидази, що руйнують лігнін і целюлозу [123, 124, 125].

2.1.4 Базидіальний гриб *Lentinula edodes* IBK-353

Базидіальний гриб *Lentinula edodes*, штаму IBK-353 з колекції культур вищих базидіоміцетів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України.

Lentinula edodes належить до класу Базидіоміцети, Порядку Агарикальні, родини Marasmiaceae, роду *Lentinula*.

Гриб *Lentinula edodes* відносять до видів їстівних грибів, який широко культивується у промисловості завдяки своїй високій харчовій цінності. У природі росте переважно на деревині, що зумовлено здатністю цього гриба синтезувати та екскретувати у середовище велику кількість ферментів, у тому числі таких, що розщеплюють лігноцелюлозу.

Також ці гриби мають протипухлинні [126, 127], імуномодулюючі [128] властивості, але ці властивості все ще вивчають у наш час, проводиться велика кількість досліджень у цьому керунку.

2.2 Живильні середовища, що були використані для культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y- 5023

Маточну культуру дріжджів підтримували на агаризованих середовищах:

1. 26% сусла, 2% агару.
2. 10% - й екстракт моркви, 1% глюкози, 1% пептону, 0,1% NaCl, 2% агару, pH = 5,0.

Для глибинного культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y- 5023 використовували синтетичні та натуральні живильні середовища.

- Синтетичні живильні середовища:

1. Середовище Рідера з 2% глюкозою як джерелом карбону (г/л) (NH_4NO_3 – 2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; MgSO_4 – 0,75; KCl – 0,4; K_2HPO_4 – 0,1; KH_2PO_4 – 1; pH=5,5);

2. Середовище YM (г/л) (глюкоза – 10, пептон – 5, мальтотріоза – 5, дріжджовий екстракт – 3, екстракту солоду – 25; pH=5,0).

- Натуральні живильні середовища:

1. Середовище CM (10% - й екстракт моркви, глюкоза – 10 г/л, пептон – 10 г/л, NaCl – 1 г/л; pH=5,0);

2. Середовище BY (екстракт пшеничних висівок – 3%, дріжджовий екстракт – 1%. Отримували екстракт у результаті термічної обробки при T=121°C під тиском 1,5 атм., протягом 90 хвилин; pH=6,8);

3. Середовище BY (екстракт пшеничних висівок – 3%, дріжджовий екстракт – 1%. Отримували екстракт у результаті термічної обробки при T=121°C під тиском 1,5 атм., протягом 90 хвилин та після додаткової термічної обробки при T=100°C, протягом 5 хвилин; pH=6,8);

4. Культуральне середовище міцеліального гриба *P. ostreatus* після 2, 8, 12 діб росту міцелію на середовищі BY, і після видалення міцелію фільтруванням (BYP -2; BYP -8; BYP -12 відповідно); pH=6,5;

5. Середовище BYP (культуральне середовище міцеліального гриба *P. ostreatus* після 2, 8, 12 діб росту міцелію на середовищі BY, і після термічної обробки при T=100°C, протягом 5 хвилин); pH=5,0;

6. Культуральне середовище міцеліального гриба *L. edodes* після 2, 8, 12 діб росту міцелію на середовищі BY, і після видалення міцелію фільтруванням (BYL -2; BYL -8; BYL -12 відповідно); pH=6,5;

7. Середовище BYL (культуральне середовище міцеліального гриба *L. edodes* після 2, 8, 12 діб росту міцелію на середовищі BY і після термічної обробки при T=100°C, протягом 5 хвилин); pH = 5,0;

8. Середовище CV - післяспиртова кукурудзяна барда (для культивування дріжджів також використовували кілька способів модифікації кукурудзяної барди:

1) змінення pH (в діапазоні від 3,4 до 7,0);

2) поділ на три фракції (верхня фракція – ВФ, середня фракція – СФ, нижня фракція – НФ), що містять механічні частинки і не містять, за допомогою осадження 2N NaOH (рН = 6,5));

9. ВУ (екстракт пшеничних висівок – 3%, дріжджовий екстракт – 1%) з додаванням кукурудзяного масла в концентраціях 50, 100, 200, 300 та 400 мг/мл середовища.

2.3 Послідовне культивування

2.3.1 Отримання культуральних фільтратів міцеліального гриба

P. ostreatus та *L. edodes*

Міцелій *P. ostreatus* та *L. edodes* (окремо) пересівали на середовище ВУ і культивували протягом 2, 8, 12 діб (на 300 мл середовища вносили 6,5 г зернового міцелію). Міцелій видаляли за допомогою фільтрування. Перед культивуванням міцелію заміряли рН вихідного середовища (воно становило 6,8). За культивування міцелію протягом 2 діб початковим індикатором змін у середовищі було незначне зниження рН середовища - на 0,3 (від початкового рН 6,8 до рН 6,5).

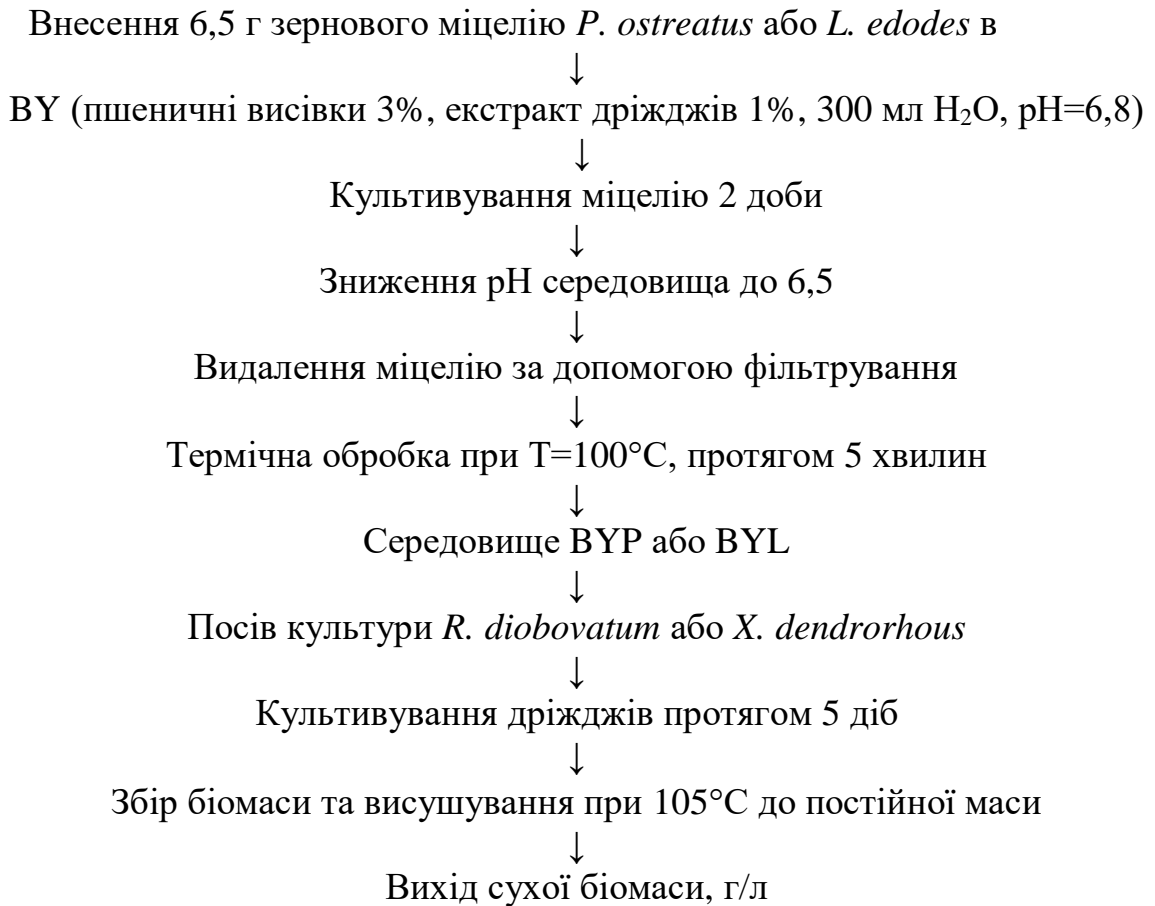
2.3.2 Визначення оптимальної пропорції компонентів живильного середовища ВУ (екстракт пшеничних висівок 3%, екстракт дріжджів 1%) для отримання середовища ВУР і оптимального часу термічної обробки цього середовища для подальшого культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y- 5023

Для визначення оптимальної пропорції компонентів живильного середовища ВУ (екстракт пшеничних висівок 3%, дріжджовий екстракт 1%) для отримання середовища ВУР, міцелій *P. ostreatus* культивували протягом 2-х діб, використовуючи такі концентрації компонентів середовища ВУ:

- 1) екстракт пшеничних висівок 1%, дріжджовий екстракт 0,3%;
- 2) екстракт пшеничних висівок 2%, дріжджовий екстракт 0,6%;
- 3) екстракт пшеничних висівок 3%, дріжджовий екстракт 1%.

Для встановлення оптимальної тривалості термічної обробки цього середовища для подальшого культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023, отримане середовище після видалення міцелію термічно обробляли при $T=100^{\circ}\text{C}$ протягом 5, 10 і 15 хвилин. Потім на ці середовища засівали дріжджі *R. diobovatum* ІМВ У-5023 і культивували протягом 5 діб. По виходу сухої біомаси визначали оптимальну пропорцію компонентів живильного середовища ВУ і оптимальну тривалість термічної обробки середовища ВУР.

2.3.3 Дизайн експерименту



2.4 Умови культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y- 5023

Перед культивуванням отримували інокулюм на рідких середовищах (для адаптації культури) для подальшого культивування. Для цього культуру дріжджів з агаризованих середовищ переносили на досліджувані рідкі середовища (1 пробірку з агаризованим середовищем промивали 10 мл свіжого середовища та отриману суспензію вносили в 50 мл рідкого середовища до колб об'ємом 300 мл).

Колби засівали п'ятидобовою культурою дріжджів (50 мл середовища в 250-мл колбі). Об'єм інокулюму становив 10 %. Культивували протягом 3-6 діб при температурі 22°C, на орбітальній качалці при 150 об/хв.

2.5 Визначення динаміки росту та виходу сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y- 5023

Для визначення динаміки росту культури дріжджів рахували кількість клітин дріжджів одразу після внесення до культури та на 1, 2, 3, 4, 5, 6 добу росту за допомогою камери Горяєва. Інтенсивність росту культури виражали кількістю клітин млн/мл. Вихід сухої біомаси визначали після 5 діб росту, для цього клітинну масу висушували при температурі 105 °C до постійної маси і виражали в г/л сухої маси.

2.6 Визначення впливу інтенсивності освітленості на ріст та синтез каротиноїдів *R. diobovatum* IMB Y- 5023

Для визначення впливу інтенсивності освітленості на ріст і синтез каротиноїдів *R. diobovatum* IMB Y- 5023, дріжджі культивували на середовищах CM, YM, BY, BYP протягом 5 діб при різних режимах освітленості: 0 лк (у темряві), 300 лк, 750 лк, 2000. лк, 5000 лк (у фітотроні POL-EKO aparatura).

2.7 Екстракція каротиноїдів і визначення їх складу

Екстракцію пігментів із клітин дріжджів здійснювали методом, як описано раніше [129], за модифікацією Gramza-Michałowska та Stachowiak [130]. До зразка сухої біомаси (з відомою вагою) або до осаду, отриманого в результаті центрифугування 10 мл культури (15 хв, 3500 g), додавали 5 мл диметилсульфоксиду (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, США), заздалегідь нагрітого до 55°C, 30 с інтенсивно струшували пробірки на вортексі. Потім до отриманої суспензії додавали 5 мл гексанової фракції нафти (POCh, Gliwice, Польща), 30 с інтенсивно струшували пробірки на вортексі, після чого додавали 20%-ний водний розчин NaCl (порціями 2 рази по 0,5 мл), інтенсивно перемішували. Гексанову фракцію з екстрагованими пігментами відділяли центрифугуванням (15 хв, 3500 g).

Загальні каротиноїди та їх якісний склад визначали за допомогою обернено-фазової (C18 колонка) ультрависокоєфективної рідинної хроматографії з іонізацією електророзпилення маспектрометрії (RP-UHPLC-ESI-MS). Аналіз каротиноїдів проводили з використанням Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Санта-Кларита, США) у поєднанні зі суміщеним Bruker Maxis надвисокої роздільної здатності з ортогональним квадрупольним час-пролітним прискорювачем (qTOF), який забезпечений джерелом ESI та керований у позитивно-іонному режимі (Bruker Daltonik, Bremen, Німеччина).

Обернено-фазове хроматографічне розділення досягалося за допомогою Kinetex™ 1,7 мкм C18 100 Å, колонка LC 100 × 2,1 мм (Phenomenex, Torrance, США). Параметри ESI-MS були наступними: напруга в капілярі 4500 В, розпилення газу 1,8 бар, а сухий газ 9 л/хв при 200°C. Діапазон сканування становив відношення маси до заряду (m/z) від 80 до 1200. Рухома фаза складалася з 70% А: 1% HCOOH у H₂O/ACN (ацетонітрилі) (5:95, об/об) і 30% В: 1% HCOOH в H₂O/THF

(тетрагідрофуран) (5:95, об/об). Усі використані розчинники були придбані в POCh (Gliwice, Польща).

Швидкість потоку становила 0,2 мл/хв з ізократичним елююванням. Об'єм введеної проби становив 2 мкл.

Температура колонки була встановлена на рівні 30°C. Система ESI-MS була відкалібрована з використанням кластерів форміату натрію, введених петлею-ін'єкцією на початку прогону LC-MS. Дані LC-MS були оброблені за допомогою програмного забезпечення аналізу даних (Data Analysis 4.1) (Bruker Daltonik, Bremen, Німеччина). Молекулярні іони $[M+H]^+$ та $[M]^+$ були отримані з повного сканування хроматограм, і площі піків були об'єднані. Вікно розпакування окремих іонних хроматограм $\pm 0,05$ m/z одиниць. β -каротин і астаксантин, наявні в кожному зразку, були ідентифіковані шляхом порівняння їх тривалості утримування з такими, що відповідають стандартам (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, США), і виходячи з молекулярної маси та структурної інформації з детектора MS.

Лікопен та торулородин були ідентифіковані на основі інформації з детектора MS, концентрація була розрахована відповідно до калібрувальної кривої для β -каротину. Калібрувальні криві: астаксантин = $247338x$ ($R^2 = 0,9961$, LOQ = 1 мкг/мл); β -каротин = $33124x$ ($R^2 = 0,9951$, LOQ = 5 мкг/мл), де x - площа піку.

Також вміст загальних каротиноїдів визначали спектрофотометрично при 450 нм, де в якості стандарту використовувався β -каротин (Sigma-Aldrich, США).

2.8 Визначення вмісту моно- і олігосахаридів у середовищах культивування

Для визначення вмісту моносахаридів та олігосахаридів у культуральному середовищі до та після росту дріжджів 10 мл вихідного середовища або культури (п'ятидобової) центрифугували (15 хвилин, 3500

g). Відбирали надосадову рідину і додавали метанол (1: 4), залишали на ніч у холодильнику. Потім отримані зразки фільтрували через мікробіологічні мембрани Millipore filter 0.45 мкм з Merck Millipore (США) для відділення великих (білкових) молекул та клітинних агрегатів.

Вміст та склад простих вуглеводів (моносахаридів та олігосахаридів) визначали іон-виключною високоефективною рідинною хроматографією з іонізацією електророзпилення маспектронетрії (ІЕНPLC-ESI-MS) з використанням Dionex UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific), об'єднаного з мас-спектрометром (qTOF, Bruker maXis impact, Bruker Daltonik) та оснащений джерелом ESI.

Розділення вуглеводів було здійснено на апараті Dionex UltiMate 3000 UHPLC на колонці RCM-Monosaccharide Ca^{+2} (8%) (phenomenex) при температурі 80° C, (права помпа 0, 4 мл/хв H_2O , ліва помпа 0,1 мл/хв 0,5% NH_4 в ACN (ацетонітрилі), при швидкості потоку 0,400 мл/хв. Подальше визначення було продовжено за допомогою мас-спетрометрії на апараті qTOF, Bruker maXis impact, Bruker Daltonik.

Деталі розділу хроматографії та параметрів ESI-MS були ретельно описані раніше Gumienna та співавторами [131].

2.9 Визначення загального вмісту ліпідів у кукурудзяній барді (CV)

Для визначення вмісту загальних ліпідів до зразків кукурудзяної барди послідовно додавали суміші органічних розчинників хлороформ - метанол (1: 2, об/об) і хлороформ - метанол - вода (1: 2: 0,8, об/об), для екстрагування. Екстракт випарювали насухо і мінералізували при 120°С протягом 20 хвилин у концентрованій сірчаній кислоті. Після цього проби розводили водою і визначали екстинкцію при довжині хвилі 400 нм на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО Росія). Вміст фракцій ліпідів розраховували по калібрувальним кривим і виражали в мкг/мл зразку [132].

2.10 Визначення складу сухого залишку досліджуваних середовищ ВУ та ВУР

Для визначення складу сухого залишку досліджуваних середовищ ВУ та ВУР середовища висушували при температурі 40° С, в результаті отримували сухий залишок, склад якого визначали у подальшому.

2.10.1 Визначення вологості

ГОСТ 1340096-3-92. Ваги ВРЛ-200.

2.10.2 Визначення вмісту золи

ДСТУ ISO 5984-2004. Ваги ВРЛ-200.

2.10.3 Визначення вмісту жиру сирого

ДСТУ ISO 6492:3003. Ваги ВРЛ-200.

2.10.4 Визначення вмісту загального нітрогену

ДСТУ ISO 5983-2003. Ваги торзійні «ВТ».

2.10.5 Визначення вмісту загального протеїну

ДСТУ ISO 5983-2003. Ваги торзійні «ВТ».

2.10.6 Визначення вмісту клітковини сирої

ДСТУ ISO 6865:2004. Ваги «Sartorius» 1201 MP2.

2.10.7 Визначення вмісту БЕР (безазотистих екстрактивних речовин)

Довідник «Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині.», Львів. 2004. Розрахунковим шляхом.

2.10.8 Визначення вмісту кальцію

ДСТУ ISO 6490-1:2004. Бюретка.

2.10.9 Визначення вмісту фосфору

ДСТУ ISO 6491:2004. КФК-2.

2.11 Визначення вмісту загального азоту в досліджуваних середовищах YM, BYP, CM

Вміст загального азоту в досліджуваних середовищах YM, BYP, CM визначали методом К'ельдаля. Вимірювання були виконані за допомогою спектрофотометру CADAS 30 S.

2.12 Визначення вмісту загального вуглецю в досліджуваних середовищах YM, BYP, CM

Вміст загального органічного вуглецю в досліджуваних середовищах YM, BYP, CM визначали за допомогою кюветного тесту LCK 387 (Hach Lange GMBH). Вимірювання були виконані за допомогою спектрофотометру CADAS 30 S.

2.13 Статистичні методи

Всі експерименти були проведені не менш ніж у трьох повтореннях. Статистичну помилку й достовірну різницю визначали, використовуючи непараметричний метод аналізу.

Оригінальні дані були перетворені на розподіл, найближчий до нормального за допомогою методу Бокса-Кокса (Box-Cox) [133]. Ієрархічний кластерний аналіз проводився з використанням правила злиття Уорда з виміром евклідової відстані (d). Ділянки дерев масштабувались до стандартизованої шкали $(Dlink/Dmax) \times 100$ [134, 135]. Розраховано коефіцієнт кореляції Спірмена [136]. Здійснено кластеризацію методом K -середніх з алгоритмом перехресної-перевірки V -подібного типу, щоб сформувати кластери [137, 138]. Метод головних компонент (МГК), який реалізується за допомогою найсучаснішого алгоритму NIPALS (нелінійних ітеративних часткових найменших квадратів), був використаний для

зменшення розмірності даних та забезпечення можливих кореляцій між змінними [139]. Усі статистичні гіпотези були перевірені при рівні значимості $\alpha = 0,05$. Значення ймовірності (Р-значення) завжди порівнювались з рівнем значимості (α), а результати були визнані статистично значимими, коли $P < \alpha$ ($P < 0,05$) [140]. Статистичний аналіз проводився за допомогою програмного забезпечення Statistica версії 10 від StatSoft, Inc, OK, USA. Огляд відповідних елементарних концепцій методів, що були використані, разом з поглибленими поясненнями, доступний на веб-сайті StatSoft [141] та в друкованій версії [142].

РОЗДІЛ 3

РІСТ *R. DIOBOVATUM* ІМВ Y-5023 НА РІЗНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Для біотехнологічного промислового процесу отримання біомаси та різних метаболітів дріжджів має велике значення тривалість культивування, що впливає на рентабельність виробництва і як наслідок на ціну цільового продукту.

Накопичення максимальної кількості каротиноїдів у клітинах дріжджів спостерігається в стаціонарній фазі росту культури, що пов'язано зі старінням культури та, ймовірно, це являється загальним механізмом захисту від окисного стресу [101]. Саме тому для отримання біомаси дріжджів з максимальною кількістю каротиноїдних пігментів у біотехнологічному виробництві, збір накопиченої біомаси необхідно проводити в стаціонарній фазі росту культури, до того як почнеться наступна стадія відмирання клітин.

Існує ціла низка наукових праць, в яких було досліджено особливості динаміки росту для різних видів каротинсинтезуючих дріжджів, що мають практичну цінність для біотехнологічного виробництва. Серед цих видів представники роду *Rhodotorula* та *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* [15]. Було встановлено, що стаціонарна фаза росту дріжджів *Rh. glutinis* настає після 50-ти годин культивування, тобто практично через дві доби від початку росту, при цьому тривалість цієї фази становить 30 годин, а вже після 80-ти годин культивування поступово починається фаза відмирання клітин. У *Sporobolomyces shibatanus* стаціонарна фаза росту триває приблизно до 155 годин культивування [53]. У дріжджів *Cystofilobasidium capitatum* стаціонарна фаза росту настає лише після 80 годин культивування й триває до 120 годин росту [15].

Водночас, у літературі дуже мало даних про характер росту і його тривалість у дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* [25, 33].

Метою даного етапу дослідження було визначення динаміки росту та виходу біомаси на живильних середовищах різного походження: синтетичного та натурального. Для визначення динаміки росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 встановлювали концентрацію клітин відразу після внесення 10% маточної культури до живильного середовища, а також через кожні 24 години росту дріжджів протягом 6 діб культивування.

3.1 Динаміка росту та вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на класичних середовищах Рідера та YM

Внаслідок 5 діб культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на класичних середовищах Рідера та YM вихід сухої біомаси був однаковим й достатньо низьким на цих середовищах (рис. 6).

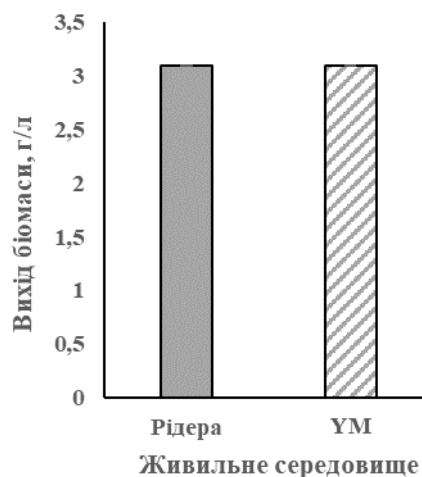


Рис. 6. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на 5-ту добу росту на синтетичних середовищах Рідера та YM

Надалі встановлювали динаміку росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі Рідера, до складу якої входять різні солі, а також глюкоза, у якості джерела вуглецю (рис. 7). Відразу після внесення культури клітин дріжджів до середовища вихідна концентрація клітин дріжджів складала менше 6 млн/мл середовища (рис. 7). При культивуванні дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на живильному середовищі Рідера лаг-фаза тривала одну добу, після чого наставала фаза експоненціального росту, яка тривала майже дві доби, а

вже після 72-х год росту наставала стаціонарна фаза росту (рис. 7). На шосту добу спостерігалось відмирання клітин, що виражалось у зменшенні кількості клітин у культурі (рис. 7). Протягом експоненційної фази росту концентрація клітин дріжджів збільшилась майже у 20 разів, у порівнянні з вихідною концентрацією (рис. 7). Максимальна концентрація клітин *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, яка збільшилась у 22,5 разів, порівняно з вихідною концентрацією, спостерігалась під час стаціонарної фази росту (рис. 7).

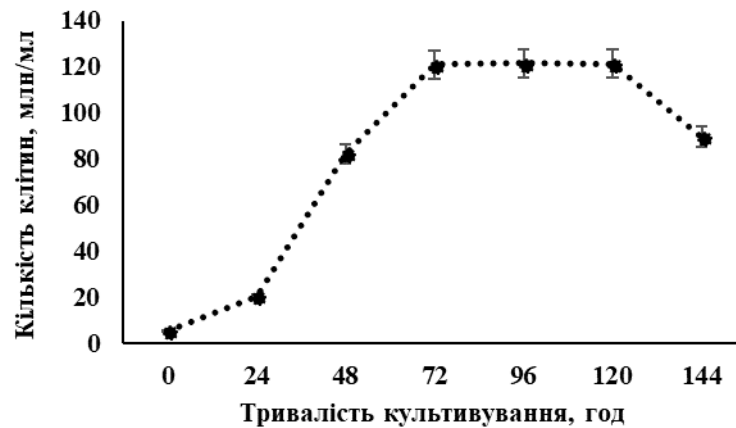


Рис. 7. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на класичному середовищі Рідера

За культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на ще одному часто використовуваному живильному середовищі YМ, до складу якого входять екстракт солоду, екстракт дріжджів, пептон, мальтотріоза та глюкоза, встановлювали кількість сухої біомаси клітин дріжджів відразу після внесення культури до середовища та після 5 діб культивування (рис. 8). Було встановлено, що за цей час росту біомаса *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 збільшилась на 71%, у порівнянні з початковою масою (рис. 8).

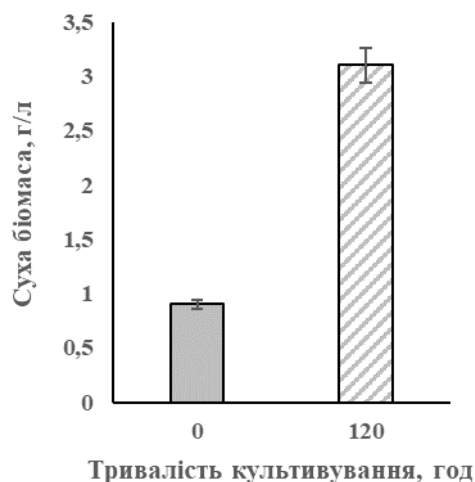


Рис. 8. Кількість сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 відразу після внесення до середовища та після 5 діб культивування на середовищі YM

Таким чином, синтетичні середовища Рідера та YM не забезпечували належного інтенсивного росту та виходу біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Раніше була показана здатність дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 рости й накопичувати значну кількість біомаси на інших синтетичних середовищах з відносно високою концентрацією глюкози - 40 г/л та 110 г/л у якості джерела вуглецю (Buzzini et al., 2007; Yurkov al 2008).

Слід зазначити, що такі живильні середовища, у тому числі й середовища Рідера та YM, належать до досить дорогих середовищ. Тому доцільним є пошук або розробка більш дешевших живильних середовищ, які здатні забезпечувати інтенсивний ріст й високий вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023. У зв'язку з цим, метою подальшого етапу дослідження було визначення динаміки росту та виходу біомаси на живильних середовищах натурального походження.

3.2 Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на натуральних живильних середовищах

Здатність *R. diobovatum* IMB Y-5023 рости на натуральних живильних середовищах, у тому числі й на відходах різних виробництв, до складу яких

входить незначна кількість глюкози або інших моносахаридів, не була достатньо досліджена до теперішнього часу. Водночас, для близького роду *Rhodotorula*, у тому числі для виду *Rh. glutinis*, була встановлена можливість культивування на таких натуральних середовищах, як відходи харчової промисловості, з отриманням високого виходу біомаси. У випадку культивування штаму *Rh. glutinis* DBVPG 3853 на буряковій патоці було отримано 9,3 г/л сухої біомаси [143]. Деякі штами *Rh. glutinis* 32 здатні накопичувати дуже велику кількість біомаси у разі культивування на патоці тростинного цукру – до 78 г/л [38].

У якості найбільш перспективних натуральних живильних середовищ для культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 можуть бути:

- екстракт висівків пшениці (ВУ);
- кукурузна барда (відходи виробництва спирту) (СВ);
- екстракт моркви (СМ).

Саме ці живильні середовища були розглянуті й досліджені, як натуральні середовища, що можуть забезпечувати більш інтенсивний ріст та більший вихід біомаси, порівняно з класичними синтетичними живильними середовищами, а також не потребують великих витрат.

3.2.1 Динаміка росту та вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі з екстракту висівків пшениці (ВУ) та культуральному фільтраті *P. ostreatus* (ВУР)

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на живильному середовищі ВУ стаціонарна фаза росту наставала після 72 год росту (рис. 9). На шосту добу культивування спостерігалось відмирання клітин (рис. 9). Концентрація клітин дріжджів при культивуванні на цьому живильному середовищі була значно вищою порівняно зі середовищем Рідера (майже у 4 рази) під час стаціонарної фази росту (рис. 7; 9).

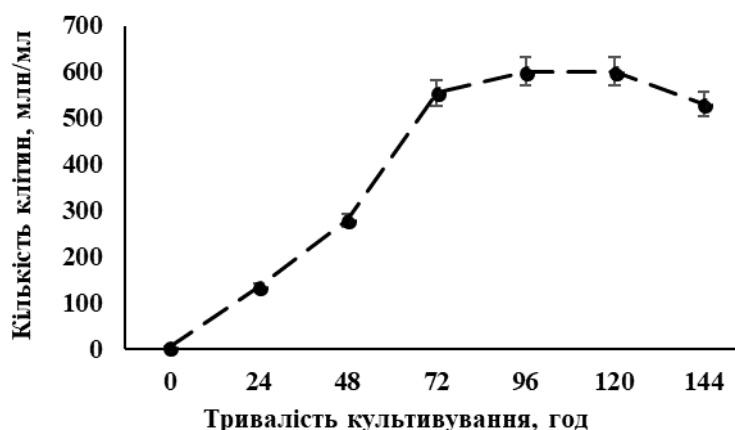


Рис. 9. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на натуральному середовищі ВУ (екстракт пшеничних висівків)

Ймовірно, не всі компоненти живильного середовища ВУ доступні для засвоєння клітинами дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, оскільки відомо, що до складу висівків входить велика кількість полімерів: 53% складають волокнисті компоненти, нерозчинні у воді. Хімічний склад цих волокон являє собою цілий комплекс, до якого входять целюлоза та пентозани – полімери, що складаються з ксилози та арабінози, пов'язаних з білками. Білки та протеїни складають близько 16% від загальної сухої маси висівків, мінерали близько 7,2% [144]. Хоча на цьому живильному середовищі концентрація клітин була значно вищою, у порівнянні з класичними синтетичними середовищами, але якщо збільшити кількість доступних компонентів для клітин дріжджів у цьому середовищі шляхом певної модифікації цього середовища, то існує ймовірність, що після її модифікації інтенсивність росту та виходу біомаси будуть ще вищими. Детально способи модифікації середовища з екстракту пшеничних висівків будуть розглянуті в наступному розділі. Саме тому, наступним етапом дослідження було встановлення динаміки росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на модифікованому живильному середовищі ВУР (екстракт пшеничних висівків після попереднього культивування *Pleurotus ostreatus* та термічної обробки 5 хвилин при 100°C).

При культивуванні *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на модифікованому живильному середовищі ВҮР вихід на стаціонарну фазу росту спостерігався тільки після 96 год культивування (рис. 10). Як і в разі живильного середовища ВҮ, після 5 діб культивування спостерігалася фаза відмирання культури (рис. 10). Але, як і очікувалося, концентрація клітин дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому живильному середовищі була найвищою (рис. 10).

Отже, найкоротша стаціонарна фаза росту дріжджів спостерігалася при найвищій концентрації клітин за культивування на живильному середовищі ВҮР. Але в двох досліджуваних живильних середовищах після 96 годин росту культура *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 перебувала у стаціонарній фазі, й у всіх випадках після 120 годин культивування наставала стадія відмирання клітин, що виражалася в зменшенні кількості клітин у культурі (рис. 9, 10).

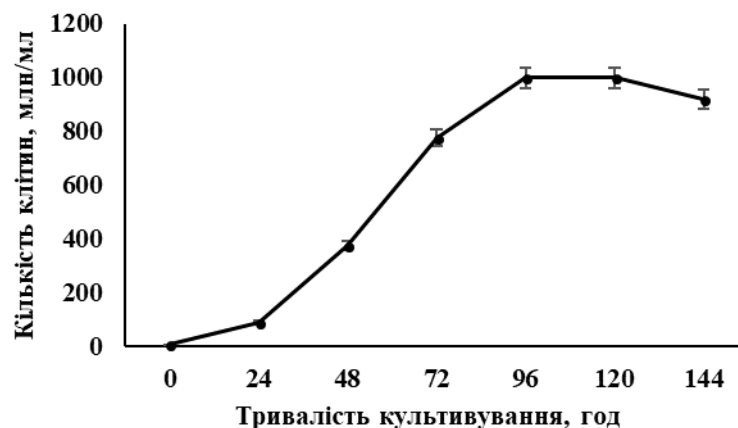


Рис. 10. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на натуральному модифікованому середовищі ВҮР (екстракт пшеничних висівок після попереднього культивування *Pleurotus ostreatus* та термічної обробки 5 хвилин при 100°C)

За культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищах ВҮ та ВҮР вихід сухої маси досліджували кожні 24 год, починаючи від 48 год росту до 120 год. Було встановлено, що після 48 год культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищі ВҮ накопичувалося на 33% менше біомаси, ніж на середовищі ВҮР (рис. 11). Упродовж наступних

24 год біомаса дріжджів на середовищі ВУ зроста на 34%, а на середовищі ВУР на 15% (рис. 11). При досягненні стаціонарної фази росту, тобто на 4-ту добу культивування на середовищі ВУ вихід сухої маси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 збільшився лише на 9,8% порівняно з попередньою добою, тоді як на середовищі ВУР – на 36,5% (рис. 11). Після 120 год культивування вихід сухої маси дріжджів суттєво не змінювався (рис. 11).

Таким чином, найбільший вихід сухої маси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на 120 год культивування був на середовищі ВУР і становив 6,9 г/л. На середовищі ВУ цей показник становив 4,2 г/л.

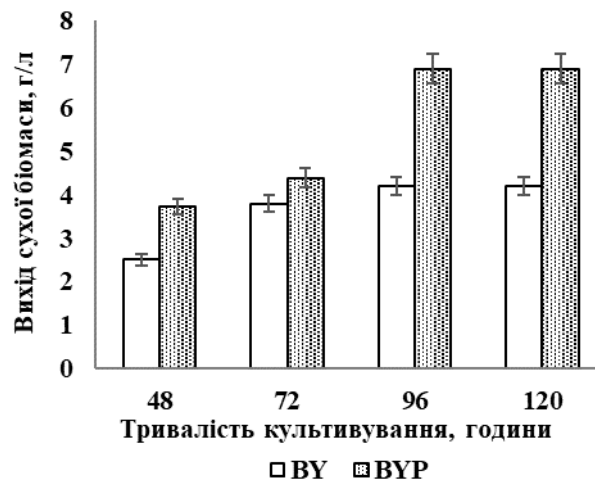


Рис. 11. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищах ВУ та ВУР

3.2.2 Динаміка росту та вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на кукурудзяній барді (CV)

Кукурудзяна барда – це відхід виробництва спирту. За культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на кукурудзяній барді виявилось, що лаг-фаза на цьому середовищі буда досить короткою (рис. 12). За 24 години росту кількість клітин дріжджів у культурі збільшувалась у 7 разів, у порівнянні з класичним середовищем Рідера. На стаціонарну фазу росту культура виходила лише після 96 годин культивування (рис. 12). Після першої доби росту інтенсивність приросту наростала з меншою швидкістю (в 11,7 та в

19 разів) через 48 і 72 години у порівнянні з вихідною концентрацією клітин, відповідно (рис. 7, 12). Як і у всіх вищеописаних випадках живильних середовищ, на кукурудзяній барді після 120 годин культивування наставала стадія відмирання клітин (рис. 12).

Ці результати свідчать про те, що ріст-визначальні компоненти, що входять до складу кукурудзяної барди, активно засвоювались клітинами дріжджів, але середовище швидше вичерпувалося, ніж середовище Рідера.

Порівняння інтенсивності росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 з іншими середовищами дозволяє зробити висновок, що на кукурудзяній барді їх інтенсивність росту була досить низькою. Вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 на кукурудзяній барді на 5-ту добу росту складала лише 2,4 г/л. Це говорить про те, що без попередньої модифікації це натуральне середовище не може бути використане як живильне середовище, що забезпечує досить інтенсивний ріст та високий вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

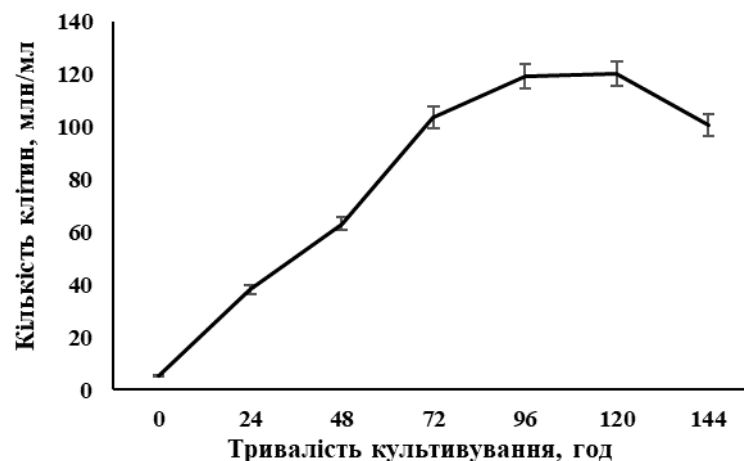


Рис. 12. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на кукурудзяній барді (CV)

3.2.3 Вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на живильному середовищі з екстракту моркви (СМ)

За культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на живильному середовищі СМ, встановлювали кількість сухої біомаси клітин дріжджів

відразу після внесення культури до середовища та після 5 діб культивування (рис. 13). Було встановлено, що за цей час росту біомаса *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 збільшилась на 88%, у порівнянні з початковою масою (рис. 13).

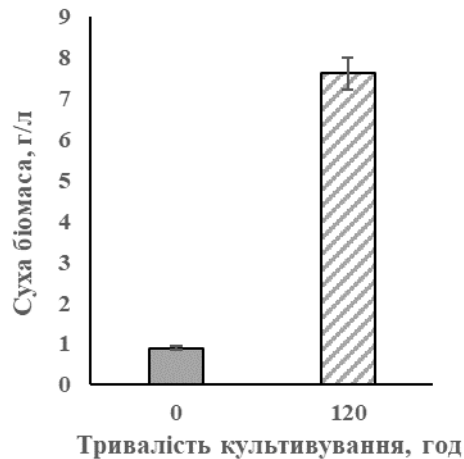


Рис. 13. Кількість сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 відразу після внесення культури до середовища та після 5-ти діб культивування на натуральному середовищі з екстракту моркви (СМ)

Висновки до розділу 3:

Таким чином, майже всі досліджувані натуральні живильні середовища, окрім кукурудзяної барди, забезпечували більш інтенсивний ріст та значно більший вихід біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у порівнянні з класичними синтетичними середовищами (рис. 14). Найбільший вихід біомаси забезпечували живильні середовища ВУР та СМ (рис. 14). Разом з цим, було встановлено, що для отримання максимального виходу біомаси, тривалість культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у рідких культурах повинна тривати не більше 5 діб, оскільки у всіх випадках на 6-ту добу наставала стадія відмирання клітин у культурі.

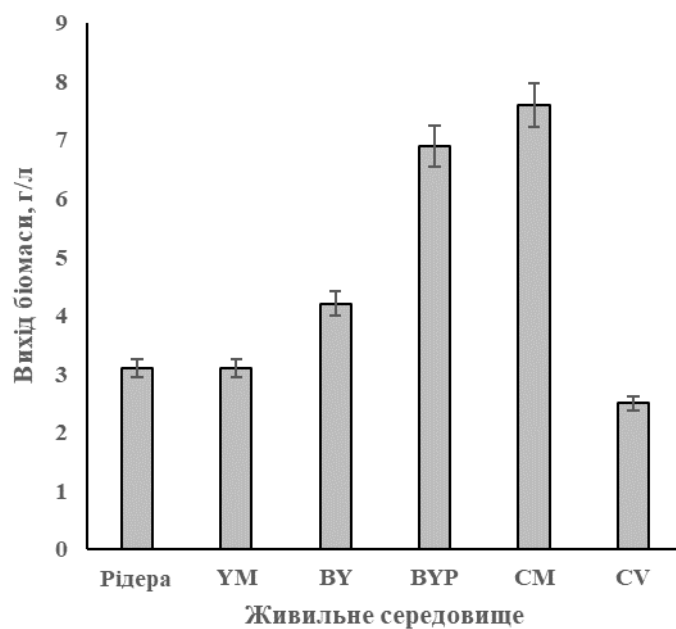


Рис. 14. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 після 5-ти діб росту на досліджуваних живильних середовищах

Основні результати розділу опубліковані у працях [145, 146, 147].

РОЗДІЛ 4

ПОСЛІДОВНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ

P. OSTREATUS, *L. EDODES* → КАРОТИНСИНТЕЗУЮЧІ ДРІЖДЖІ

Як вже було описано у третьому розділі, деякі натуральні живильні середовища потребують певної модифікації для того, щоб вони могли забезпечувати досить інтенсивний ріст та високий вихід біомаси дріжджів. Метою даного етапу дослідження була розробка способів модифікації живильного середовища з екстракту висівок пшениці ВУ.

Часто до складу натуральних живильних середовищ входить велика кількість полімерів, у тому числі полісахаридів, та незначна кількість моносахаридів. Здебільшого, полісахариди погано засвоюються клітинами дріжджів. Крім того, в таких середовищах можуть бути відсутні необхідні для росту дріжджів чинники зростання. Виділення, очищення та внесення таких чинників до середовищ культивування дріжджів у промислових умовах недоцільно.

Для вирішення питань, пов'язаних зі збільшенням інтенсивності росту дріжджів, було зроблено припущення про доцільність біологічної модифікації природних живильних середовищ, завдяки чому живильні середовища зможуть збагатитись моносахаридами і, можливо, чинниками росту, й забезпечити кращий ріст дріжджів.

Суть біологічної модифікації природних живильних середовищ полягала у послідовному культивуванні на екстракті висівок пшениці грибів з подальшим культивуванням дріжджів. Передбачалося, що короткострокове культивування базидіальних грибів *P. ostreatus* та *L. edodes*, зможе забезпечити розщеплення полісахаридів екстракту висівок до моносахаридів й олігосахаридів, а також, можливо, збагатити середовище екзометаболітами грибів, які можуть вплинути на інтенсивність росту дріжджів.

Як відомо, гриби здатні екскретувати в середовище різноманітні гідролітичні ферменти, що забезпечують розщеплення полімерів [122, 125].

Для вирішення цього завдання великий інтерес можуть становити базидіоміцети *P. ostreatus* і *L. edodes* при глибинному культивуванні, в зв'язку з тим, що їх біомаса має високу харчову і кормову цінність, а також з тим, що вони не екскретують токсичних речовин у середовище та екскретують гідролази [148]. Водночас, важливим є те, щоб під час росту грибів не вичерпалася значна кількість поживних речовин у середовищі, що також може призвести до низької інтенсивності росту дріжджів.

Саме тому, метою подальшого етапу дослідження було встановлення оптимального часу попереднього культивування базидіоміцетових грибів *P. ostreatus* та *L. edodes* на живильному середовищі ВУ.

4.1 Тривалість культивування міцелію *P. ostreatus* та *L. edodes*

Міцелій *P. ostreatus* штаму НК-35 та *L. edodes* пересівали на контрольне середовище ВУ і культивували протягом 2, 8, 12 діб. Видаляли міцелій за допомогою фільтрування через 2, 8 або 12 діб росту відповідно, а в подальшому на цих культуральних фільтратах культивували дріжджі протягом 5 діб і визначали їх динаміку росту, а також вихід сухої біомаси після культивування.

Було встановлено, що культуральні середовища *P. ostreatus* та *L. edodes*, отримані в результаті культивування міцелію протягом 2, 8, 12 діб на контрольному середовищі ВУ надають різний ефект на динаміку росту *R. diobovatum* ІМВ У-5023.

На першу добу культивування на культуральних середовищах *P. ostreatus* після 2, 8 та 12 діб культивування міцелію (ВУР-2, ВУР-8, ВУР -12) ріст культури був практично однаковим на середовищі ВУР-8 та на контрольному середовищі ВУ (рис. 15). Досліджувані середовища ВУР-2 і ВУР -12 впродовж 24 годин викликали затримку росту дріжджів (рис. 15). На 4-ту та 5-ту добу культивування на цих середовищах кількість клітин була у 1,7 разів менше, ніж на контрольному середовищі ВУ (рис. 15).

Культуральне середовище ВУР-8 не впливало на інтенсивність росту *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на 1 і 2 добу культивування, але надавало стимулюючий ефект на 3, 4 та 5 добу, при цьому кількість клітин збільшувалася на 14%, у порівнянні з контрольним середовищем ВУ (рис. 15).

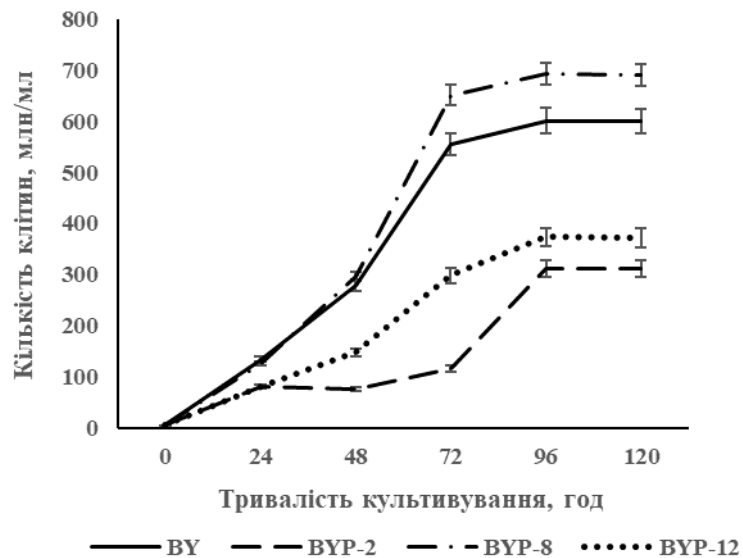


Рис.15. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 за культивування на культуральних середовищах *P. ostreatus* різного віку:

ВУ - контроль - екстракт пшеничних висівок;

ВУР -2 - культуральне середовище *P. ostreatus* після 2 діб росту міцелію на середовищі ВУ;

ВУР -8 - культуральне середовище *P. ostreatus* після 8 діб росту міцелію на середовищі ВУ;

ВУР -12 - культуральне середовище *P. ostreatus* після 12 діб росту міцелію на середовищі ВУ

Таким чином, за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищах після попереднього росту міцелію *P. ostreatus*, незалежно від його тривалості, не було виявлено значного стимулюючого ефекту цих середовищ на ріст дріжджів.

Культуральні середовища *L. edodes*, отримані в результаті культивування міцелію протягом 2, 8, 12 діб на контрольному середовищі ВУ

(BYL-2, BYL-8, BYL-12) також надавали різний ефект на інтенсивність росту *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, але в усіх випадках ці середовища пригнічували ріст дріжджів, у порівнянні з середовищем ВУ (рис. 16). Було встановлено, що ступінь пригнічення інтенсивності росту дріжджів залежить від тривалості культивування міцелію. Найбільший пригнічувальний ефект спостерігався у разі культивування дріжджів на культуральному середовищі BYL-2, при цьому на 4-ту та 5-ту доби росту кількість клітин *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 була у 4,2 рази меншою, ніж на контрольному середовищі ВУ (рис. 16). На культуральному середовищі BYL-8 кількість клітин дріжджів на 4-ту та 5-ту доби росту була меншою в 2,6 разів у порівнянні з середовищем ВУ (рис. 16). Найменший пригнічувальний вплив на ріст *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 спостерігався у разі культивування дріжджів на культуральному середовищі BYL-12, при чому кількість клітин на 4-ту та 5-ту доби росту була меншою лише у 2 рази, у порівнянні з контрольним середовищем ВУ (рис. 16).

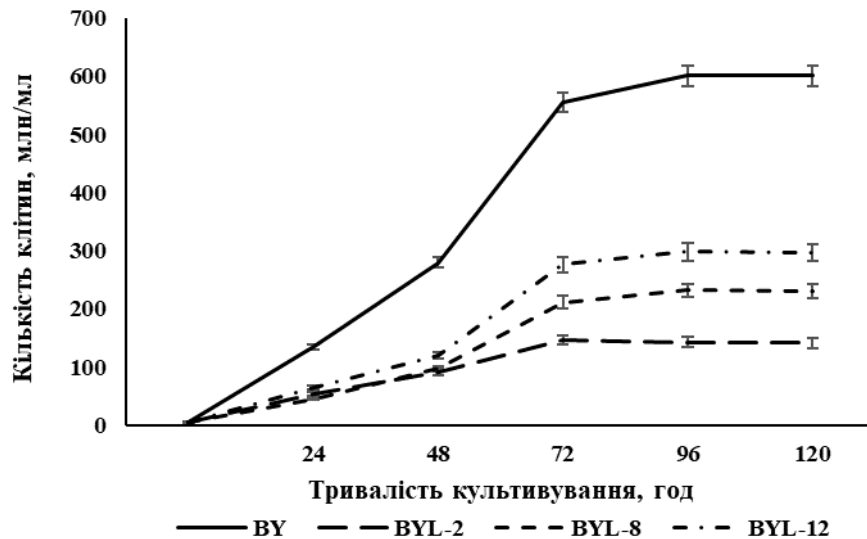


Рис. 16. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на культуральних середовищах *L. edodes* різного віку:

ВУ - контроль - екстракт пшеничних висівок;

BYL -2 - культуральне середовище *L. edodes* після 2 діб росту міцелію на середовищі ВУ;

BYL -8 - культуральне середовище *L. edodes* після 8 діб росту міцелію на середовищі ВУ;

BYL -12 - культуральне середовище *L. edodes* після 12 діб росту міцелію на середовищі ВУ

Таким чином, культуральні середовища *P. ostreatus* та *L. edodes*, отримані внаслідок культивування міцелію цих грибів на контрольному середовищі ВУ, впливають по-різному на інтенсивність росту *R. diobovatum* ІМВ У-5023, в залежності від тривалості культивування міцелію. Здебільшого, ці культуральні середовища пригнічували ріст дріжджів. Це може бути пов'язано з тим, що в процесі росту *P. ostreatus* та *L. edodes* екскретують у середовище компоненти, які володіють інгібуючою активністю по відношенню до *R. diobovatum* ІМВ У-5023. Якщо ці компоненти термолабільні, то їх можна інактивувати за допомогою термічної обробки. В зв'язку з цим, метою наступного етапу дослідження було встановлення динаміки росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на описаних вище контрольному середовищі ВУ, а також на культуральних середовищах *P. ostreatus* та *L. edodes*, після їх термічної обробки.

4.2 Вплив термічної обробки культуральних середовищ *P. ostreatus* та *L. edodes* на ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023

На початку даного етапу дослідження проводили термічну обробку контрольного середовища ВУ. Виявилося, що термообробка цього середовища супроводжувалася зниженням інтенсивності росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на 33% у порівнянні з цим же середовищем без термообробки (рис. 17). Якщо на контрольному середовищі без термообробки кількість клітин на 4 добу культивування збільшувалася в 110 разів у порівнянні з вихідною концентрацією клітин, то після додаткової термообробки цього середовища тільки у 83 рази (рис. 17).

У тому випадку, коли *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 культивували на середовищі ВУР-2 після його термічної обробки, то на 4 добу росту дріжджів концентрація клітин у культурі збільшилась у 3 рази в порівнянні з тим же середовищем без термічної обробки (рис. 17). Необхідно відзначити, що практично такий же ефект стимуляції росту *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 спостерігався і на середовищах після 8 та 12 діб попереднього культивування *P. ostreatus*, тобто на середовищах ВУР-8 та ВУР-12, відповідно, після їх термічної обробки (рис. 17). Однак, на середовищі ВУР-2 після його термічної обробки інтенсивність росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 була найвищою у порівнянні з контрольним середовищем ВУ, ВУ після термічної обробки, ВУР-8, ВУР-12 без та після їх термічної обробки, а також ВУР-2 без термічної обробки (рис. 15, 17).

Якщо порівнювати збільшення кількості клітин дріжджів при послідовному культивуванні *P. ostreatus* → *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 (тобто у разі культивування дріжджів на середовищі ВУР-2) після термообробки з контрольним середовищем ВУ без термообробки, то необхідно зазначити, що на контрольному середовищі вихідна кількість клітин збільшувалася в 110 разів за 4 доби росту, а при послідовному культивуванні у 184 рази (рис. 15, 17). Було встановлено, що в стаціонарній фазі росту культури *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 (4 - 5 доби культивування) кількість клітин дріжджів на живильному середовищі ВУР-2 після термообробки була майже на 40% більшою, ніж на контрольному середовищі ВУ без термообробки й на 55% більшою, ніж на середовищі ВУ після термообробки (рис. 15, 17). Водночас, на середовищі ВУР-2 після термічної обробки кількість клітин дріжджів під час стаціонарної фази росту була на 69% більшою, ніж на тому ж середовищі без термообробки (рис. 15, 17).

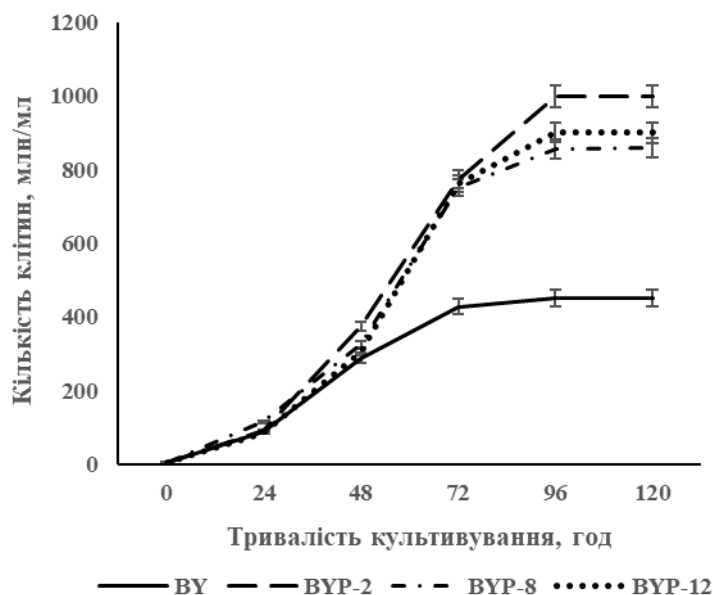


Рис. 17. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на контрольному середовищі (BY), на тому ж середовищі після культивування *P. ostreatus* протягом 2, 8 та 12 діб (BYP-2, BYP-8 та BYP-12) та після 5 хвилин термічної обробки (100° C) цих середовищ

Отже, короткострокова термічна обробка контрольного середовища BY приводила до зменшення інтенсивності росту дріжджів, а термообробка контрольного середовища після 2-12 діб культивування *P. ostreatus* значно збільшувала інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023. Ці результати можуть свідчити про інактивацію компонентів, які були екскретовані у середовище міцелієм *P. ostreatus* й пригнічували ріст дріжджів та збільшення доступності компонентів живильного середовища для засвоєння клітинами *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Для підтвердження цього було визначено вихід сухої біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 на 5 добу культивування на контрольному середовищі BY без термообробки і при послідовному культивуванні (на середовищі BYP-2) після термообробки. Було виявлено, що вихід сухої біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 на контрольному середовищі на 5 добу росту був на 64% менше, ніж при послідовному культивуванні (рис. 18).

Можна вважати, що такий стимулюючий ефект при послідовному культивуванні (після 2 діб культивування міцелію) з термообробкою середовища *P. ostreatus* (BYP) пов'язаний з двома можливими механізмами. Термообробка забезпечує збільшення вмісту моносахаридів або олігосахаридів у середовищі після культивування *P. ostreatus* і/або інактивує інгібітори росту *R. diobovatum* IMB Y-5023, які можуть з'явитись у середовищі після росту *P. ostreatus*. Однак, незалежно від механізмів дії можна стверджувати, що термообробка модифікує середовище після росту *P. ostreatus*. Існує практичний інтерес визначення видової «специфічності» такої модифікації середовища культивування.

З цією метою був визначений вихід сухої біомаси іншого виду каротинсинтезуючих дріжджів – *X. dendrorhous* DSM 5626 на контрольному середовищі BY (без термічної обробки) і на модифікованому середовищі BYP (після 2 діб росту міцелію *P. ostreatus* та після термічної обробки). Виявилося, що за культивування *X. dendrorhous* DSM 5626 на контрольному середовищі вихід сухої біомаси на 5 добу росту становив лише 1,2 г/л, тоді як на модифікованому середовищі BYP-2 після термічної обробки вихід був у 6 разів більшим й становив понад 7 г/л, що навіть перевищило вихід сухої біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 на цьому середовищі (рис. 18).

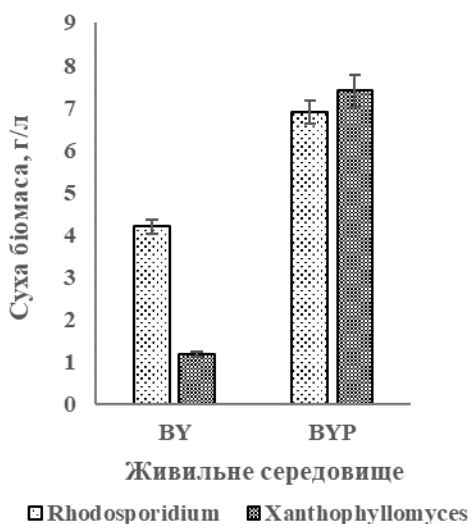


Рис. 18. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 та *X. dendrorhous* DSM 5626 на середовищах BY без термічної обробки та BYP

після 2 діб росту міцелію та термічної обробки (5 хвилин, 100° C) на 5-ту добу культивування

Отже, існує велика ймовірність, що культивування *P. ostreatus* протягом 2-х діб і термообробка модифікували і збагачували середовище моносахаридами, олігосахаридами та іншими компонентами, необхідними для росту дріжджів, і це не пов'язано з видовими особливостями дріжджів.

У тому випадку, коли *R. diobovatum* IMB Y-5023 культивували на середовищі BYL-2 після його термічної обробки, то на 4 добу росту (стаціонарна фаза росту) дріжджів концентрація клітин у культурі збільшилась на 18,5% у порівнянні з тим же середовищем без термічної обробки (рис. 19). Кількість клітин *R. diobovatum* IMB Y-5023 у разі культивування на середовищах BYL-8 та BYL-12 після їх термічної обробки під час стаціонарної фази росту збільшилась на 14% та 5,5%, відповідно, у порівнянні з тими ж середовищами без термічної обробки (рис.19). Але усі три живильні середовища BYL-2, BYL-8, BYL-12 після термічної обробки значно пригнічували ріст дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 у порівнянні з контрольним середовищем BY без термічної обробки та після його термічної обробки (рис. 16, 19).

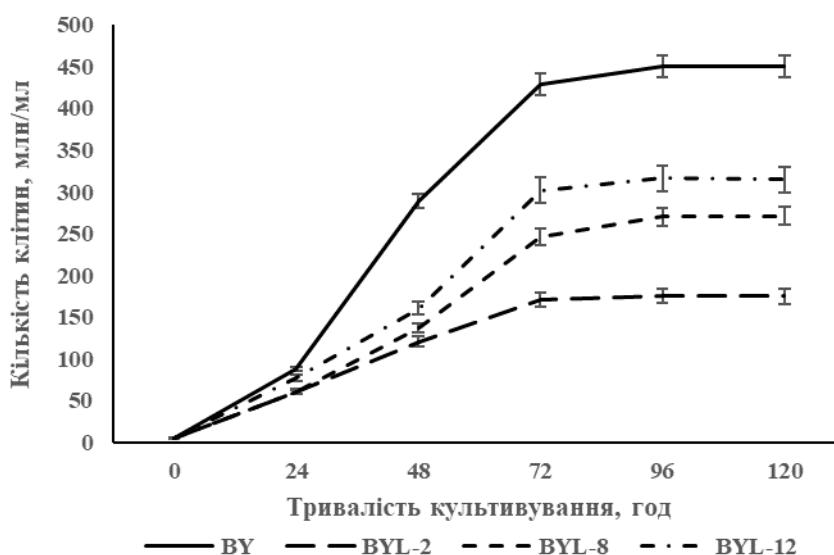


Рис. 19. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на контрольному середовищі (BY), на тому ж середовищі

після культивування *L. edodes* протягом 2, 8 та 12 діб (BYL-2, BYL-8 та BYL-12) та після 5 хвилин термічної обробки (100° C) цих середовищ

Таким чином, використовувати попереднє культивування міцелію *L. edodes* для модифікації контрольного середовища ВУ недоцільно.

В зв'язку з цим, у подальших дослідженнях для обґрунтування доцільності використання послідовного культивування для модифікації контрольного середовища вивчали склад лише того середовища, яке найбільше стимулювало ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, тобто середовища ВУР (середовище ВУ після 2 діб росту міцелію *P. ostreatus* та термічної обробки (5 хвилин, 100° C).

4.3 Підбір оптимальної концентрації компонентів контрольного середовища ВУ та оптимальної тривалості термічної обробки середовища ВУР

Напочатку даного етапу дослідження встановлювали оптимальну концентрацію компонентів (пшеничних висівок та сухого екстракту дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*) контрольного середовища ВУ, а також оптимальний час термічної обробки культурального середовища ВУР.

Для цього встановлювали вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на середовищі ВУР з трьома різними концентраціями компонентів базового контрольного середовища, а також після різної тривалості термічної обробки середовища (табл. 2).

Таблиця 2

Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за їх культивування на середовищах ВҮР з різною концентрацією його складників й після різної тривалості термічної обробки (5-15 хвилин)

Концентрація, %	Тривалість термічної обробки, хв	pH середовища	Біомаса, г/л
Висівки – 1; дріжджі – 0,3	5	5,7	4,25±0,13
Висівки – 1; дріжджі – 0,3	10	5,65	3,54±0,08
Висівки – 1; дріжджі – 0,3	15	5,6	3,35±0,09
Висівки – 2; дріжджі – 0,6	5	5,65	4,27±0,25
Висівки – 2; дріжджі – 0,6	10	5,6	4,85±0,23
Висівки – 2; дріжджі – 0,6	15	5,55	4,12±0,22
Висівки – 3; дріжджі – 1	5	5,7	6,9±0,15
Висівки – 3; дріжджі – 1	10	5,55	6,32±0,05
Висівки – 3; дріжджі – 1	15	5,5	5,95±0,16

Було встановлено, що оптимальна концентрація пшеничних висівок та сухого екстракту дріжджів *S. cerevisiae* для росту *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у середовищі культивування повинна складати 3% та 1%, відповідно (табл. 2).

Оптимальна тривалість термічної обробки середовища ВУР повинна складати 5 хвилин (табл. 2).

4.4 Характеристика контрольного та модифікованого середовищ

Контрольне живильне середовище ВУ істотно змінилося після культивування *P. ostreatus* протягом 2-х діб та термічної обробки протягом 5 хвилин. Вміст золи зменшився на 26%, а вміст жирів був зменшений у 2,4 рази в порівнянні з вихідним середовищем (табл. 3). Також культивування *P. ostreatus* протягом 2-х діб та термічна обробка середовища супроводжувалися зменшенням загального азоту і протеїну на 23% (табл. 3). Вміст кальцію і фосфору достовірно не змінювався. При цьому вміст безазотистих екстрактивних речовин (БЕР) збільшувався на 23% у порівнянні контрольним середовищем ВУ (табл. 3). Як відомо, до складу БЕР входять моно-, ди-, трисахариди, крохмаль, глікоген, частина пектинових речовин і геміцелюлоз, камеді та органічних кислот.

Таблиця 3

Склад живильних середовищ - контрольного (ВУ) та після 2 діб культивування *P. ostreatus* на контрольному середовищі й після 5 хвилин термічної обробки (ВУР), у відсотках (%)

Середовище	Зола	Жир сирий	Загальний азот	Загальний протеїн	БЕР	Кальцій	Фосфор
ВУ	15,5 ±0,8	1,6 ±0,08	5,9 ±0,3	36,9 ±1,8	45,9 ±2,1	0,27 ±0,01	2,6 ±0,1
ВУР	11,4 ±0,5	0,7 ±0,03	4,6 ±0,2	28,6 ±1,4	59,4 ±2,7	0,24 ±0,01	2,3 ±0,1

Визначення змісту загальних моно- і олігосахаридів показало, що їх кількість збільшилася в 3,5 рази після культивування *P. ostreatus* й термічної обробки (табл. 4). Аналіз індивідуальних компонентів показав, що 2-х добове

культивування *P. ostreatus* на контрольному середовищі протягом 2 діб супроводжувалося значним збільшенням насамперед глюкози в 278,5 разів, пентосахаридів у 13,7 разів, трисахаридів у 3,2 рази, у той час як вміст фруктози зменшився в 1,7 рази в порівнянні з її вмістом у контрольному середовищі (табл. 4).

Таблиця 4

Вміст низькомолекулярних цукрів (мкг/мл) у контрольному середовищі (ВУ) та в середовищі після 2 діб культивування *P. ostreatus* на контрольному середовищі й після 5 хвилин термічної обробки (ВУР)

Вміст цукрів, мкг/мл	Досліджуване середовище	
	ВУ	ВУР
Дисахариди	160,74±5,7	163,88±6,0
Трисахариди	2870,95±49,2	9249,89±67,3
Тетрасахариди	134,29±4,3	1325,81±21,8
Пентасахариди	6,04±0,3	82,74±3,5
Гексасахариди	0,91±0,04	4,46±0,2
Рабіноза	0	0
Фруктоза	1,87±0,09	1,04±0,05
Галактоза	0	0
Глюкоза	1,19±0,05	331,38±7,6
Рибоза	0	0
Ксилоза	0	0
Всього	3175,98±51,1	11159,19±97,6

Отже, попереднє культивування на контрольному середовищі *P. ostreatus* забезпечувало модифікацію цього середовища, яка супроводжувалася значним збільшенням кількості глюкози та інших низькомолекулярних цукрів, а також зменшенням вмісту жирів і протеїнів.

Разом з тим, таке збільшення вмісту низькомолекулярних цукрів у середовищі могло б сприяти більшому ефекту стимуляції росту *R. diobovatum*

ІМВ Y-5023. Це дозволяє припустити, що в середовищі культивування присутні компоненти, які частково «стримують» ріст дріжджів.

Попереднє культивування на контрольному середовищі *P. ostreatus* модифікує середовище і це проявлялося в пригніченні росту дріжджів на такому середовищі. Оскільки, інгібуючий ефект був добре виражений і проявлявся вже через 2 доби після зростання міцелію *P. ostreatus*, то мало ймовірно, що за цей час гриби встигали спожити значну частину вуглеводів, що входили до складу середовища. Можна вважати, що за цей час міцелієм *P. ostreatus* екскретувались у середовище екзометаболіти, які пригнічували ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Більш того, в процесі росту гриби екскретують різноманітні гідролітичні ферменти, які активно гідролізують целюлозу і геміцелюлози [149, 150]. В свою чергу, це може призвести до додаткового збагачення середовища моно- і олігосахаридами. На користь цього свідчать дані, наведені в таблиці 3.

Однак, стимулюючий ефект модифікованого грибами середовища проявлявся тільки після додаткової 5-хвилинної термічної обробки. Ці результати дозволяють припускати, що інгібуючий ефект попереднього культивування *P. ostreatus* пов'язаний з екскрецією екзометаболітів, що пригнічують ріст *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

На користь цього свідчать результати погіршення росту дріжджів після термообробки контрольного середовища ВУ. Крім цього, ці результати вказують на те, що така обробка не може забезпечити додатковий гідроліз полісахаридів. Такий гідроліз реалізується тільки після культивування *P. ostreatus*, тобто після екскреції міцелієм гідролітичних ферментів у середовище.

Необхідно відзначити, що подібний інгібуючий ефект попереднього культивування *P. ostreatus* на ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 не слід розглядати як наявність серед екзометаболітів токсичних сполук. Ймовірніше за все, що цей механізм реалізується за типом дії алелопатичних речовин.

Явище алелопатії було відкрите у 1937 році Гансом Молішем (Hans Molisch) [151].

Відомо, що у відповідь на стресові чинники, рослини можуть підсилювати активність екскреторної системи й значно змінювати склад виділених у середовище речовин [152]. Зокрема показано, що у відповідь на вплив зовнішніх екстремальних факторів рослини екскретують у середовище велику кількість фенольних сполук [153].

Оскільки, внесення *P. ostreatus* в глибинну культуру являється для них стрес-фактором, то можна вважати, що в таких умовах гриби можуть екскретувати термолабільні речовини, що володіють інгібуючим ефектом по відношенню до дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Висновки до розділу 4:

Підсумовуючи вищеописане у цьому розділі, слід зазначити, що модифікація натурального живильного середовища ВУ, за допомогою попереднього культивування *P. ostreatus* та короткострокової термічної обробки, може бути використана у якості ефективного методу для стимуляції росту культури дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Використовувати попереднє культивування міцелію *L. edodes* для модифікації контрольного середовища ВУ недоцільно.

Основні результати розділу опубліковані у працях [154, 155, 156, 157, 158].

РОЗДІЛ 5

ВИКОРИСТАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ У ЯКОСТІ СУБСТРАТІВ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ДРІЖДЖІВ *R. DIOBOVATUM* IMB Y-5023

Однією з глобальних проблем сучасності являється утилізація відходів промисловості, які забруднюють довкілля. Органічні відходи харчової, сільськогосподарської та інших галузей можуть бути утилізовані різними мікроорганізмами. Завдяки тому, що дріжджі – це хемоорганотрофи, які здатні засвоювати широкий спектр речовин, деякі органічні відходи промисловості можуть бути використані у якості субстратів для культивування дріжджів, у тому числі й *R. diobovatum* IMB Y-5023. Саме тому, метою наступного етапу дослідження була розробка можливих способів оптимізації живильного середовища кукурудзяної барди (яку отримують внаслідок виробництва спирту) для подальшого ефективного використання в культивуванні дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

5.1 Способи модифікації кукурудзяної барди (CV)

Досить часто на підприємствах з виробництва спирту у якості сировини окрім пшениці також використовується кукурудза. Як відомо, у складі кукурудзи міститься багато жирів [159], які потрапляють до рідкої фракції барди. Як впливають ліпідні компоненти кукурудзяної барди на динаміку росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 не досліджено.

Відомо, що дріжджі *R. diobovatum* також відносять до мікроорганізмів, що здатні накопичувати у своїй біомасі більше 20% ліпідів, в залежності від живильного середовища і умов культивування [26]. Такі мікроорганізми, які здатні накопичувати значну кількість ліпідів у своїй біомасі, становлять інтерес в якості джерел масел, необхідних для синтезу біодизельного палива [42]. До них також відносять *Rhodospiridium toruloides* [160], *Rhodospiridium babjevae* [26], *Rh. glutinis* [161] та інші. У своїй роботі Munch та співавтори

(2015) досліджували вплив чистого гліцерину і гліцерину, отриманого з відходів виробництва біодизелю, як єдиного джерела вуглецю, на накопичення біомаси та ліпідів у ній клітинами дріжджів *R. diobovatum* 08-225. Було показано, що при культивуванні на таких середовищах, з обмеженням кількості азоту в них, *R. diobovatum* 08-225 накопичували до 14 г/л біомаси з вмістом ліпідів у ній до 50% від всієї клітинної маси.

Дослідження впливу ліпідів на динаміку росту *R. diobovatum* становить інтерес не тільки з позицій підготовки промислових живильних середовищ, але й для розуміння механізмів регуляції проліферації клітин дріжджів.

У даному розділі визначали вплив ліпідних компонентів кукурудзяної барди на динаміку росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

5.1.1 Визначення оптимального значення рН кукурудзяної барди для росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023

У першому розділі була описана динаміка росту та вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 на вихідній кукурудзяній барді (стор. рис.12).

Низька інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на кукурудзяній барді, у порівнянні з середовищем ВУ може пояснюватися низьким вихідним значенням рН цього середовища, яке становило 3,4. У зв'язку з цим, у подальших серіях дослідження визначали вихід сухої біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 при їх культивуванні на кукурудзяній барді з різним значенням рН (у діапазоні 3,4 – 7,0). Було встановлено, що при рН = 5,0 - 6,5 інтенсивність росту дріжджів була на 34% вищою у порівнянні з вихідним середовищем, а при рН = 7,0 їх інтенсивність росту знову знижувалася, на 28% у порівнянні з рН = 5,0 (рис. 20).

Отже, підвищення рН кукурудзяної барди до 5,0 - 6,5 забезпечувало посилення їх росту, однак, вони росли гірше порівняно з середовищем ВУ (вихід сухої біомаси дріжджів був на 17% меншим, ніж на середовищі ВУ).

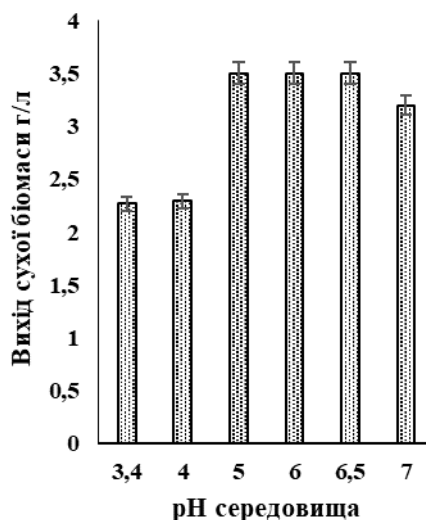


Рис. 20. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за їх культивування на кукурудзяній барді при значеннях pH від 3,4 до 7,0

Більш низька інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на кукурудзяній барді порівняно з екстрактом пшеничних висівок (середовищем ВУ) може бути пов'язана ще з декількома чинниками: недостатньою кількістю цукрів та інших поживних речовин; поганим засвоєнням поживних речовин, що містяться у кукурудзяній барді; наявністю чинників у ній, що пригнічують ріст дріжджів. До таких чинників можуть бути віднесені ліпіди, оскільки відомо, що кукурудзяна барда містить більшу кількість ліпідів у порівнянні з екстрактом пшеничних висівок (ВУ) [159].

5.1.2 Поділ кукурудзяної барди на три фракції та динаміка росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на них

Оскільки барда гетерогенна за складом, її розділяли на 3 складові фракції.

Верхня легка фракція (ВФ) не містила механічних частинок, середня фракція (СФ) містила багато дрібних механічних залишків із зерна кукурудзи, а нижня важка фракція (НФ) являла собою великі механічні

частинки у великій кількості. Динаміка росту дріжджів на цих трьох фракціях була різною (рис. 21).

Кількість клітин дріжджів за 2 доби культивування на НФ збільшувалася в 5 разів у порівнянні з вихідною кількістю й надалі залишалася майже незмінною (рис. 21А)

Набагато краще дріжджі росли на СФ. Після 3 діб культивування кількість клітин *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цій фракції збільшувалася в 17,2 рази (рис. 21А).

Однак, найкраще культура *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 росла на ВФ. Кількість клітин вже через добу культивування була в 16 разів більшою, ніж вихідна кількість, а на 2 і 3 добу росту в 63 і 77 разів, відповідно, більшою, що відповідало кількості клітин на середовищі ВУ (рис. 21А).

Про різну швидкість росту *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на різних фракціях кукурудзяної барди свідчить також й вихід сухої біомаси дріжджів на 3 добу культивування (рис. 21Б).

Необхідно зазначити, що вихід сухої біомаси дріжджів за їх культивування на ВФ кукурудзяної барди після видалення механічних частинок і доведення рН до 5,0 - 6,5 був майже таким же, як і на екстракті пшеничних висівок (ВУ), і становив 4,5 - 5,0 г/л сухих дріжджів за 3 доби росту (рис. 21Б).

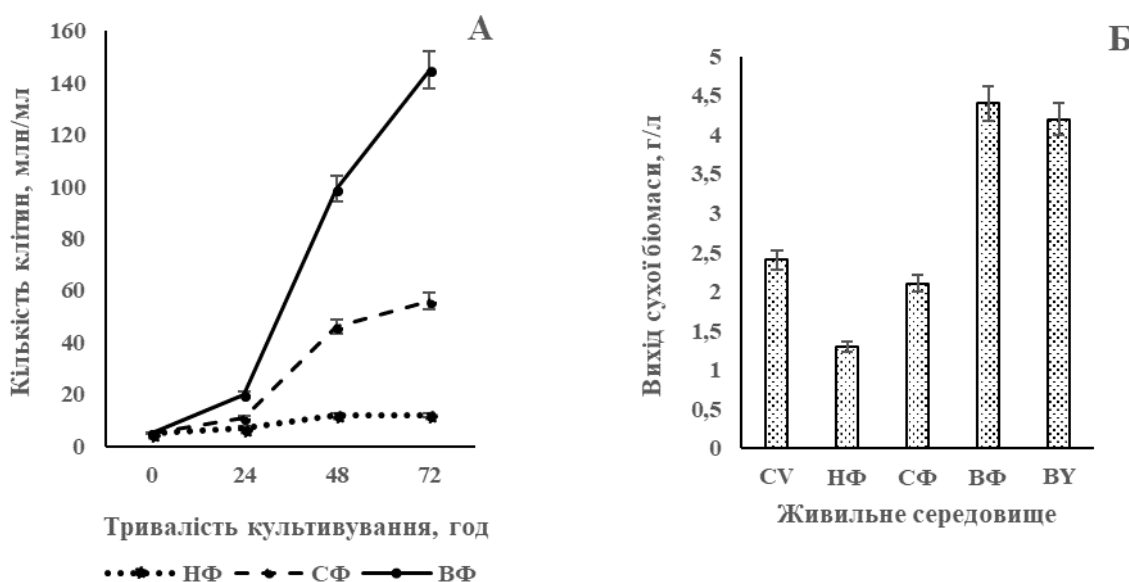


Рис. 21. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на різних фракціях кукурудзяної барди (А); Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на вихідному середовищі (CV), на різних фракціях кукурудзяної барди та на екстракті пшеничних висівок (BY) після 3 діб росту (Б)

5.2 Визначення вмісту загальних ліпідів у 3-х фракціях кукурудзяної барди і їх впливу на ріст *R. diobovatum* ІМВ Y-5023

Як вже було зазначено вище, кукурудза містить велику кількість ліпідів і їх значна частина може залишатися в барді. Найбільше ліпідів було виявлено у ВФ і їх вміст становив 334 мг/мл, а в середній (СФ) і нижній фракціях (НФ) у 3 та 2,2 рази менше (рис. 22А).

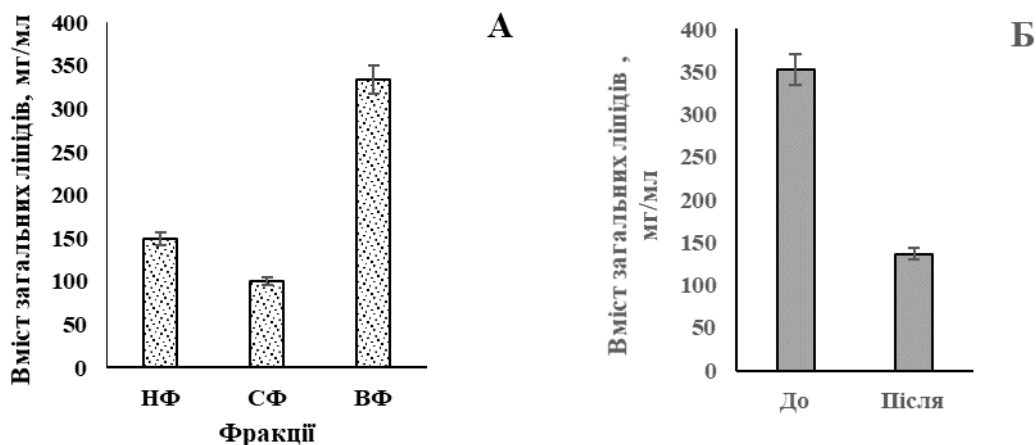


Рис. 22. Вміст загальних ліпідів у різних фракціях кукурудзяної барди (А); вміст загальних ліпідів до та після культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 у верхній фракції (ВФ) (Б)

Необхідно зазначити, що між вмістом ліпідів у кукурудзяній барді та інтенсивністю росту дріжджів на СФ і НФ барди була відсутня пряма кореляція. Таким чином, у СФ містилося 100,3 мг/мл ліпідів, а в НФ 148,9 мг/мл, при цьому інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на СФ була вищою, ніж на НФ (рис. 21; 22).

У наступній серії експериментів визначали вміст ліпідів у ВФ до та після 3 діб культивування дріжджів. Було виявлено, що після 3 діб росту дріжджів, вміст ліпідів у ВФ зменшився у 2,5 рази порівняно з їх вихідною кількістю (рис. 22Б).

Отже, дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 активно засвоювали ліпідні компоненти кукурудзяної барди.

Разом з цим було виявлено, що саме у верхній фракції кукурудзяної барди, де містилося понад 300 мг/мл ліпідів і культура дріжджів інтенсивно росла, клітини *R. diobovatum* IMB Y-5023 утворювали агрегати, які були відсутні в контрольній культурі й у зразках, що росли на СФ і НФ.

Отже, видалення механічних залишків з барди і високий вміст ліпідів у ній забезпечували досить інтенсивний ріст дріжджів, який не відрізнявся від

росту культури на середовищі ВУ. Можна вважати, що наявність ліпідів у барді в такій кількості стимулювала ріст культури *R. diobovatum* ІМВ У-5023.

Для перевірки цього, на наступному етапі дослідження визначали інтенсивність росту *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищі ВУ з додаванням різної кількості ліпідів кукурудзи. При підборі концентрації ліпідів виходили з того, що у фракції кукурудзяної барди (ВФ) на якій вихід біомаси дріжджів був найвищим, містилося 300 мг/мл ліпідів.

Суспензії ліпідів готували на середовищі ВУ в концентраціях 50, 100, 200, 300, 400 мг/мл ліпідів.

Інтенсивність росту культури *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищі ВУ з додаванням 50 мг/мл ліпідів кукурудзи незначно збільшувалася тільки на початку культивування, через 24 години і 48 годин росту збільшувалася приблизно на 30-32% порівняно з контрольним середовищем ВУ (рис. 23).

Збільшення вмісту ліпідів кукурудзи в середовищі до 100 мг/мл збільшувало інтенсивність росту дріжджів на 60, 41, 12 і 18% через 24, 48, 72, 96 годин культивування, відповідно (рис. 23).

Найбільший ефект стимуляції росту культури спостерігали після внесення до середовища культивування 300 мг/мл ліпідів кукурудзи. Кількість клітин була збільшена на 71, 65, 26, 36% порівняно з контрольним середовищем через 24, 48, 72 і 96 годин відповідно (рис. 23). Збільшення вмісту ліпідів у середовищі до 400 мг/мл незначно пригнічувало ріст культури порівняно з середовищем, що містило 300 мг/мл ліпідів кукурудзи (рис. 23).

Слід зазначити, що за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на цих середовищах з додаванням ліпідів у концентраціях від 50 до 400 мг/мл, клітини дріжджів утворювали агрегати, як і при зростанні на ВФ (рис. 24).

Отже, ліпіди кукурудзи стимулюють ріст *R. diobovatum* ІМВ У-5023, найбільший ефект стимуляції виявлявся в перші 24-48 годин культивування. Оптимальна концентрація ліпідів для росту дріжджів становить 300 мг/мл.

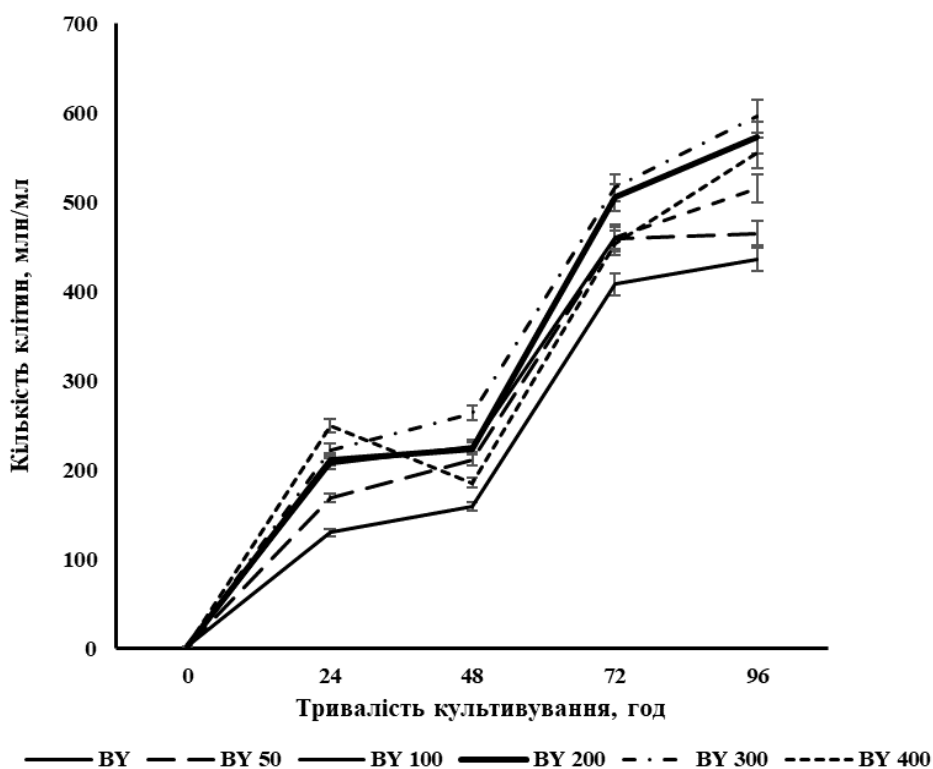


Рис. 23. Динаміка росту культури дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на живильному середовищі ВУ з додаванням ліпідів кукурудзи в концентраціях 50, 100, 200, 300, 400 мг/мл

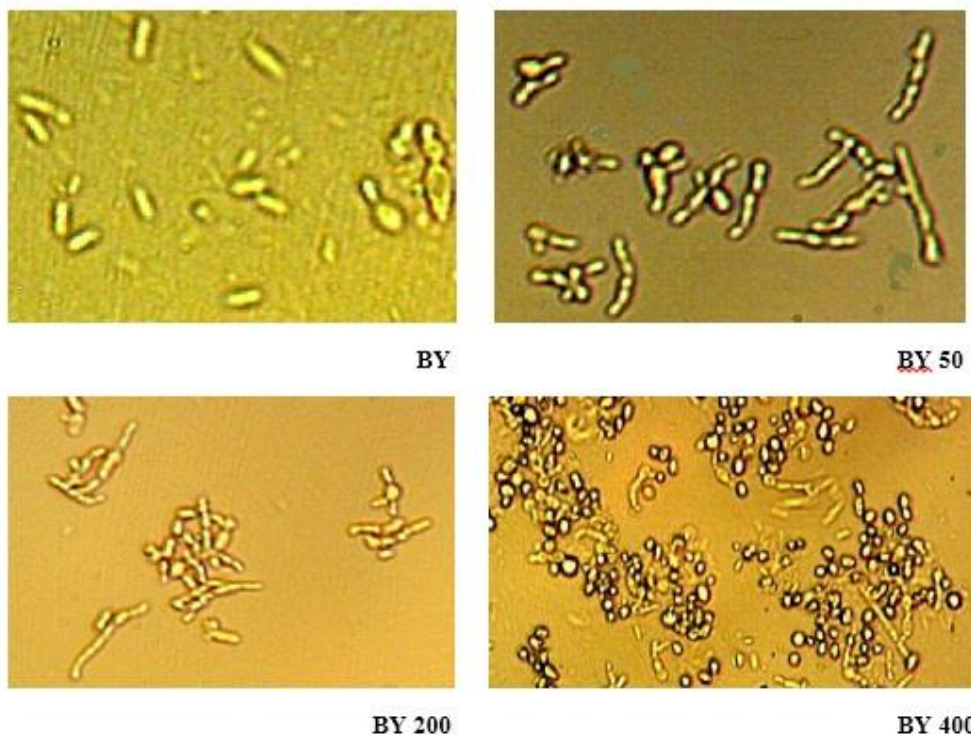


Рис. 24. Утворення клітинних агрегатів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за їх культивування на живильному середовищі ВУ з додаванням ліпідів кукурудзи в концентраціях 50 - 400 мг/мл

Як відомо, ріст мікроорганізмів також як й інших організмів є складним інтегративним процесом. Під інтегративністю процесу росту слід розуміти створення «єдиної» функціональної динамічної системи між метаболізмом організму і компонентами середовища, а точніше його мікрооточення.

Як створюється це єднання? З одного боку, метаболізм, завдяки наявності альтернативних метаболічних шляхів, формує такий метаболічний паттерн, який забезпечує йому саморегуляція в конкретному середовищі, тобто організм використовує ті компоненти для росту і розмноження, які його оточують в даний момент часу. З іншого боку, організм як відкрита система, виділяючи в середовище метаболіти, динамічно «підлаштовує» своє мікрооточення під обрану метаболічну стратегію функціонування. Як наслідок, метаболічна система організму і компоненти мікрооточення формують єдину динамічну систему - "ЄДС". Чим швидше буде сформована ЄДС, тим коротшою буде лаг-фаза, чим ефективніше формується ЄДС, тим вища швидкість розмноження культури. У тому ж випадку, коли ЄДС не буде сформована через «несумісності» між можливостями метаболізму і компонентами мікрооточення, то культура гине.

Ефективність формування ЄДС залежить від великої кількості факторів та умов. Концептуально, можна виділити тільки деякі з них: особливості генотипу, тобто структурно-динамічна організація генетичної системи. Найважливішою характеристикою ЄДС являється наявність генів, що забезпечує альтернативні метаболічні шляхи, тобто метаболізм цукрів, ліпідів і т.д. Другою особливістю генетичної системи є її нестабільність або динамічне адаптивне перетворення. Як відомо, нестабільність геному мікроорганізмів забезпечується плазмідами [162, 163], транспозонами [164], високою мутабельністю й горизонтальним переносом генів [165].

Не менш важливими в цьому «єднанні» «організм - середовище» являються епігенетичні механізми. Встановлено, що зміна середовища

культивування впливає на характеристики і ступінь метилювання ДНК [166] та інші малодосліджені у мікроорганізмів епігенетичні механізми.

Наступним найважливішим фактором являються особливості метаболічної регуляції, а точніше кількість альтернативних метаболічних шляхів в одному організмі. Відомо, що дріжджі здатні одночасно засвоювати різні субстрати [15]. На користь цього свідчить і той факт, що один і той же вид або штам може рости з однаковою швидкістю на різних субстратах [25]. При цьому вони накопичують різну кількість метаболітів. *R. diobovatum* IMB Y-5023 можуть накопичувати однакоvu кількість біомаси за одиницю часу на середовищі ВУ та на кукурудзяній барді. Раніше було показано, що *R. diobovatum* IMB Y-5023 на різних середовищах накопичує різну кількість каротиноїдів та інших метаболітів [36]. На користь ефективного використання альтернативних метаболічних шляхів дріжджями *R. diobovatum* IMB Y-5023 свідчить дослідження Munch зі співавторами [26]. Ці автори показали, що *R. diobovatum* 08-225 може культивуватися на чистому гліцерині в якості єдиного джерела вуглецю. При цьому інтенсивність росту дріжджів була високою - вони накопичували до 14 г/л біомаси і в ній містилося до 50% ліпідів. Ці дріжджі можуть бути перспективним джерелом біодизельного палива [161,160, 42].

Про здатність дріжджів роду *R. diobovatum* засвоювати ліпіди свідчать результати наших досліджень. При цьому необхідно зазначити, що існує добре виражена дозова залежність між збільшенням швидкості росту культури і вмістом ліпідів у середовищі культивування (рис. 23).

Наявність «зони» насичення ліпідними компонентами може свідчити про наявність генетико-метаболічних видових обмежень.

Поряд з генетико-метаболічними особливостями формування ЄДС, таку ж роль, а, можливо, і визначаючу в цьому відіграє й особливість мікрооточення. Необхідно зазначити, що найважливішими особливостями мікрооточення являються: 1 - висока швидкість зміни параметрів - її фізико-хімічні характеристики (рН, в'язкість, осмотичність, температура та ін.), 2 -

формування градієнтів навколо функціонально активних клітин. Це градієнти компонентів середовища, які формуються за рахунок протилежної спрямованості потоків виділення екзометаболітів та поглинання нутрієнтів, градієнти температури, виділення тепла клітиною, градієнти рН і т.д., й, нарешті, наявність інгібіторів та стимуляторів росту в середовищі для даного представника мікроорганізмів.

Результати цього етапу дослідження дозволяють вважати, що поряд з необхідними нутрієнтами для *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у кукурудзяній барді містяться також інгібітори росту дріжджів. Після поділу її на фракції, компоненти важкої фракції середовища (НФ) не «забезпечували» ефективного формування ЄДС, тобто інтенсивності накопичення біомаси. Так, незважаючи на невеликі відмінності вмісту ліпідів у середній (СФ) та нижній фракціях (НФ) інтенсивність росту *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 в них сильно відрізнялася (рис. 21, 22).

Висновки до розділу 5:

Дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть рости на середовищах, у складі яких міститься багато ліпідів, і кукурудзяна барда після її попередньої підготовки (її поділ шляхом флотації або сепарування, а також доведенням рН до 5-6,5) може бути використана для промислового виробництва біомаси дріжджів, багатої каротиноїдами та іншими біологічно активними речовинами.

Основні результати розділу опубліковані у працях [167, 168].

РОЗДІЛ 6

КАРОТИНОГЕНЕЗ ДРІЖДЖІВ

R. DIOBOVATUM IMB Y-5023

Серед пігментованих дріжджів представники лише декількох невеликих таксономічних груп були детально досліджені на вміст каротиноїдних пігментів [36]. Як вже було вказано вище у попередніх розділах, дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 здатні до синтезу каротеноїдних пігментів, у зв'язку з чим являють інтерес для біотехнології. Однак, у наш час існує лише кілька наукових праць про біотехнологічне застосування деяких штамів *Rhodospiridium diobovatum* [169], все ще дуже мало інформації в наукових дослідженнях про вміст каротиноїдів у біомасі цих дріжджів в залежності від різних умов культивування та живильних середовищ.

Відомо, що на синтез каротеноїдів клітинами дріжджів впливає велика кількість чинників: склад живильних середовищ, температура, аерація, світло, рН середовища, співвідношення вуглецю до азоту C/N в середовищі росту [38].

У зв'язку з цим на даному етапі дослідження визначали вплив видимого світла різної інтенсивності та складу трьох різних живильних середовищ на накопичення біомаси й синтез каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

6.1 Визначення динаміки накопичення каротиноїдів у клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023

Максимальна кількість накопичення каротиноїдних пігментів у клітинах дріжджів спостерігається під час стаціонарної фази росту культури. Це пов'язано зі старінням культури, а також, ймовірно, що це загальний механізм захисту від окисного стресу. За допомогою гасіння кисневих радикалів каротиноїди можуть сприяти збереженню життєздатності

старіючих клітин й, можливо, таким чином компенсувати в них відсутність антиоксидантних ферментів [101].

Як вже було зазначено у першому розділі, на рентабельність біотехнологічного виробництва впливає тривалість культивування дріжджів. Саме тому, на даному етапі дослідження визначали динаміку накопичення каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023 за їх культивування на натуральних живильних середовищах ВУ та ВУР у темряві, щоб перевірити на яку добу культивування в клітинах цих дріжджів накопичується максимальна кількість пігментів. Вказані живильні середовища були обрані для виконання встановленого даного завдання в зв'язку з тим, що за культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищах ВУ та ВУР спостерігалася різна інтенсивність росту культури й різний вихід біомаси, для того, щоб можна було встановити, чи залежить динаміка накопичення каротиноїдів у біомасі цих дріжджів від низької та високої інтенсивності росту й накопичення біомаси.

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищах ВУ та ВУР вміст загальних каротиноїдів і їхній якісний склад у біомасі досліджували кожні 24 години, починаючи від 48 годин росту (фаза експоненціального росту) до 120 (кінець стаціонарної фази росту).

За культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ВУ вже після 48 годин росту вміст загальних каротиноїдів був у 2,3 рази менший порівняно з їхнім вмістом у біомасі після культивування на середовищі ВУР (рис. 25). Після 72 годин культивування дріжджів різниця між цим показником незначно зросла до 2,4 разів (рис. 25), тоді як у стаціонарній фазі росту (96 і 120 годин культивування) вона зменшувалася до 2 і 1,85 разів відповідно (рис. 25).

Якщо розглянути окремо динаміку накопичення загальних каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на ВУ і ВУР середовищах, то можна зробити висновок, що вона подібна до характеру накопичення біомаси, тобто загальна кількість

каротиноїдів збільшувалася впродовж кожної наступної доби культивування дріжджів. Слід відзначити одну важливу відмінність, яка полягає в тому, що у стаціонарній фазі росту (96–120 годин культивування) біомаса *R. diobovatum* IMB Y-5023 була сталою (рис. 11), тоді як вміст каротиноїдів зростав у цей період і був максимальним після 120 годин культивування на обох середовищах (рис. 25). Це підтверджує той факт, що найбільший вміст каротиноїдних пігментів у клітинах дріжджів спостерігають у стаціонарній фазі росту при старінні культури.

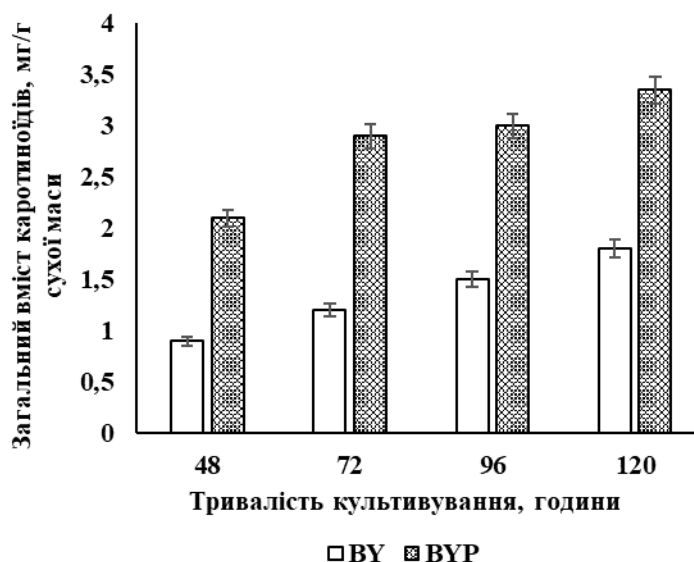


Рис. 25. Загальний вміст каротиноїдів у сухій біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 після 2, 3, 4, 5-у діб культивування на ВУ і ВУР середовищах

Відомо, що одним з основних пігментів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* є β -каротин [25]. Співвідношення пігментів у клітинах дріжджів залежить від умов культивування [41].

У результаті аналізу профільного складу каротиноїдів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 було встановлено, що за культивування на цих досліджуваних живильних середовищах, у клітинах синтезуються наступні пігменти: β -каротин, астаксантин, лікопен (табл. 5).

За культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищах ВУ і ВУР із збільшенням тривалості росту зростала не тільки кількість загальних

каротиноїдів у біомасі, але й змінювалося кількісне співвідношення між пігментами (табл. 5). Таким чином, після 48 годин росту дріжджів на середовищі ВУ було виявлено, що у їх біомасі на β -каротин припадає майже 11% від загальної кількості пігментів, на астаксантин – 1%, на лікопен – 88 % (табл. 5). У процесі росту культури це співвідношення змінювалося у бік зростання кількості β -каротину й зменшення лікопену, а після 120 годин культивування на β -каротин припадало 50 % від загальної кількості пігментів, на лікопен – 48,9 % (табл. 5). Слід зазначити, що відсоткова доля, яка приходилася на астаксантин майже не змінювалася у процесі росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 й після 120 годин культивування становила лише 1,1% (табл. 5).

Після 48 годин росту дріжджів у середовищі ВУР було виявлено, що в їхній біомасі на β -каротин припадає майже 19 % від загальної кількості пігментів, на астаксантин – лише 0,5 %, на лікопен – 80,5 % (табл. 5). Як і у разі культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ВУ кількісне співвідношення між пігментами змінювалося в бік зростання кількості β -каротину й зменшення лікопену, й після 120 годин культивування на β -каротин припадало 48,9 % від загальної кількості пігментів, на лікопен – 49,6 % (табл. 5). Відсоткова доля, яка приходилася на астаксантин незначно зростала й після 120 годин культивування становила 1,5 % (табл. 5).

Таблиця 5

**Вміст каротиноїдів у сухій біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023
(мг/г с/б; $M \pm m$; $n=5$)**

Живильне середовище	Тривалість культивування, години	β -каротин	Астаксантин	Лікопен
ВУ	48	$0,1 \pm 0,005$	$0,01 \pm 0,0005$	$0,8 \pm 0,04$
	72	$0,2 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,0007$	$1,0 \pm 0,05$

ВУР	96	$0,34 \pm 0,017$	$0,02 \pm 0,001$	$1,14 \pm 0,05$
	120	$0,9 \pm 0,045$	$0,02 \pm 0,001$	$0,88 \pm 0,04$
	48	$0,4 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,0005$	$1,7 \pm 0,08$
	72	$0,81 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,001$	$2,08 \pm 0,1$
	96	$1,1 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,001$	$1,87 \pm 0,09$
	120	$1,64 \pm 0,08$	$0,05 \pm 0,002$	$1,66 \pm 0,08$

Підсумовуючи отримані дані, слід зазначити, що незалежно від того, на якому живильному середовищі проводити культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, природнього чи синтетичного походження, й як наслідок незалежно від інтенсивності росту культури, після 120 годин (5 діб) культивування спостерігається зниження інтенсивності росту – фаза відмирання клітин. Швидкість настання стаціонарної фази росту культури залежить від інтенсивності росту – чим більша інтенсивність, тим пізніше настає стаціонарна фаза росту (рис. 7, 9-12). Оскільки максимальна кількість біомаси накопичувалася після 96-120 годин культивування, а найбільша кількість каротиноїдів у ній була виявлена тільки після 120 годин росту *R. diobovatum* IMB Y-5023, то тривалість культивування повинна складати не менше 120 годин (5-ти діб), для отримання максимальної кількості біомаси з найбільшим вмістом каротиноїдів.

6.2 Визначення складу та кількості каротиноїдних пігментів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023 на досліджуваних синтетичних та натуральних живильних середовищах у темряві

У зв'язку з отриманими вище результатами, на даному етапі досліджень визначали вміст та профільний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 після 5 діб культивування у темряві на синтетичних та натуральних живильних середовищах.

За культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на класичному синтетичному середовищі Рідера після 120 годин росту у темряві загальний вміст пігментів становив 3,7 мг/г біомаси (табл. 6). Більша частина каротеноїдів приходилася на лікопен й становила 75,1%, астаксантин становив 1,6 % від загальної кількості каротиноїдів, решта припадала на β -каротин (табл. 6).

У разі культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на синтетичному середовищі YМ після 120 годин росту у темряві загальний вміст каротеноїдів був у 6,75 разів більшим, ніж на середовищі Рідера (табл. 6). Аналіз пігментного складу каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5 діб росту на середовищі YМ дозволив виявити 4 пігменти: лікопен, β -каротин, астаксантин і торулородин. На лікопен доводилося 55,5%, β -каротин - 38,1%, торулородин - 5,6% і 0,8% на астаксантин від загального вмісту (табл. 6).

Таким чином, незважаючи на те, що за культивування на цих двох синтетичних середовищах Рідера та YМ після 5 діб росту вихід біомаси дріжджів був однаковим (рис. 6), загальний вміст каротиноїдних пігментів та їх склад дуже відрізнялись.

За культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на натуральних середовищах ВY та ВYР після 120 годин росту у темряві загальний вміст пігментів у біомасі дріжджів та їх профільний склад були описані вище (табл. 5).

У разі культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на натуральному середовищі СМ після 120 годин росту у темряві загальний вміст каротиноїдів був у 1,5 більшим, ніж на середовищі ВYР та майже у 2,8 разів більшим, ніж на середовищі ВY (табл. 5, 6). Аналіз профільного складу пігментів після культивування на середовищі СМ показав, що у біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 містилися три пігменти, як і у випадку культивування на середовищах ВY та ВYР, при цьому на лікопен доводилося

82,4%, на β -каротин тільки 15,6%, вміст астаксантину становив 2% від загальних каротиноїдів, а торулородин не був виявлений (табл. 6).

Таблиця 6

**Склад та кількість каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів
R. diobovatum IMB Y-5023 після 5 діб культивування на досліджуваних
живильних середовищах у темряві, (мг/г сухої б /м;)**

Живильне середовище	β -каротин	Астаксантин	Лікопен	Торуло- родин	Вміст загальних каротиноїдів
Рідера	0,86 \pm 0,04	0,06 \pm 0,003	2,78 \pm 0,13	0,00	3,7 \pm 0,15
УМ	9,51 \pm 0,07	0,21 \pm 0,01	13,86 \pm 0,56	1,42 \pm 0,02	24,98 \pm 0,92
СМ	0,78 \pm 0,02	0,1 \pm 0,01	4,13 \pm 0,15	0,00	4,99 \pm 0,18

Таким чином, за культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на цих натуральних середовищах, найбільша кількість загальних каротиноїдів була виявлена на середовищі СМ, при цьому якісний склад пігментів був однаковий, але відрізнявся за кількісним співвідношенням (табл. 5, 6).

У разі культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на всіх п'яти досліджуваних живильних середовищах синтетичних та натуральних, після 5 діб росту у темряві найбільша кількість загальних каротиноїдних пігментів була виявлена на синтетичному середовищі УМ, якісний склад пігментів на цьому середовищі теж відрізнявся від усіх інших середовищ. Зважаючи на вищеописані результати, слід зазначити, що каротеноїди в клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023 синтезуються у великій кількості навіть за культивування цих дріжджів у темряві.

6.3 Взаємозв'язок між накопиченням біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 та вмістом каротиноїдних пігментів у ній за культивування на досліджуваних живильних середовищах у темряві

За культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі Рідера після 5 діб росту у темряві вихід біомаси та вміст загальних каротиноїдів у ній були досить низькими (рис. 26).

Після 5 діб росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 у темряві на середовищі YM, яке забезпечувало низький вихід біомаси, було виявлено високий вміст загальних каротиноїдів у ній (рис. 26).

Вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на натуральному середовищі ВУ після 120 годин росту у темряві був більшим, ніж на синтетичних середовищах Рідера та YM, але вміст каротиноїдних пігментів був найнижчим з усіх досліджуваних середовищ (рис 26). Водночас за культивування дріжджів у темряві на середовищі ВУР, яке забезпечувало відносно високий вихід біомаси, вміст каротиноїдів був у 7,5 разів меншим порівняно із середовищем YM (рис.26).

Можна було припустити, що на середовищі CM, яке забезпечувало найвищий вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування впродовж 5 діб у темряві, вміст загальних каротиноїдів буде меншим, ніж в середовищі ВУР. Однак, це припущення не відповідало дійсності, їх вміст виявився на 33% більшим, ніж на середовищі ВУР, але у 5 разів меншим порівняно із середовищем YM (рис. 26).

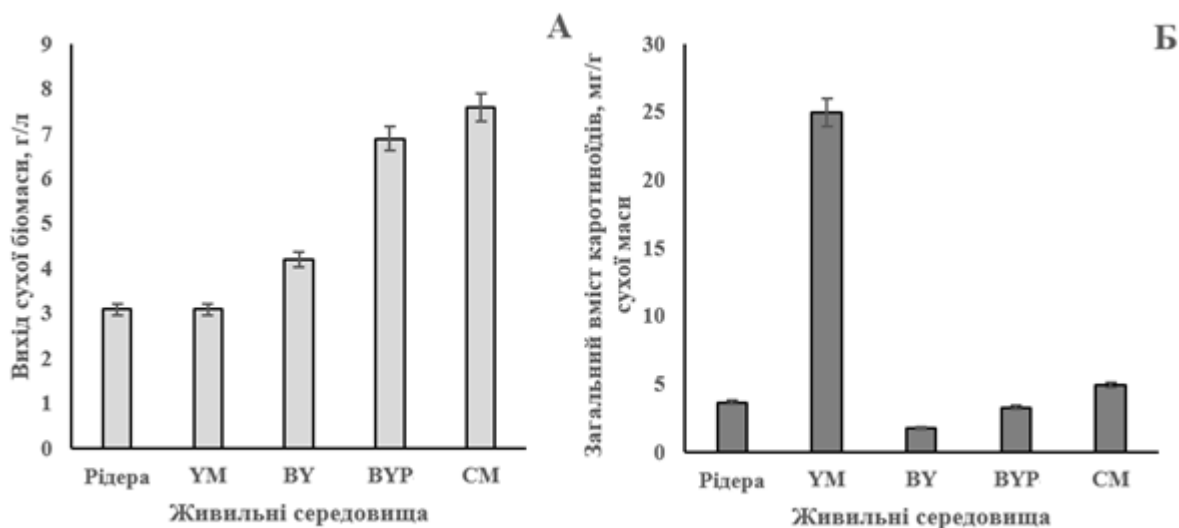


Рис.26. Вихід сухої біомаси (А) та загальний вміст каротиноїдних пігментів у ній (Б) дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування у темряві на досліджуваних живильних середовищах упродовж 5 діб росту

Таким чином, прямого взаємозв'язку між накопиченням біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на досліджуваних живильних середовищах у темряві та вмістом каротиноїдних пігментів у ній не виявлено. Це може бути пов'язано із багатьма чинниками, у тому числі, з умовами культивування, які впливають на метаболізм клітин дріжджів.

6.4 Вивчення впливу видимого світла різної інтенсивності на накопичення біомаси та синтез каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах

Однією з фундаментальних функцій каротеноїдів у клітинах дріжджів являється захист від активного кисню, тобто від окисного стресу [97], а також вони забезпечують захист від сонячного світла (315-400 нм) та видимого світла (фотосинтетично активної радіації, 400–700 nm) [31, 130].

Відомо, що в природних популяціях дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 зустрічаються як у ґрунтах (зростання у темряві), так і у водних

середовищах, у тому числі у жолобах на великій глибині океану (теж зростання у темряві або при незначній кількості сонячного світла) [33], а також на рослинних об'єктах (освітлена поверхня) [169]. Однак, у наш час все ще залишається відкритим питання про вплив інтенсивності світла на ріст і синтез каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Водночас, відомо, що інтенсивність освітлення є одним із чинників регуляції каротиногенезу [120].

Оскільки, однією із найважливіших функцій каротиноїдів у клітинах дріжджів являється фотопротекторна функція, то, ймовірно, що світло буде стимулювати синтез каротиноїдних пігментів у клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Виходячи з цього, метою даного етапу досліджень було визначення виходу біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, а також загального вмісту каротиноїдів й співвідношення різних фракцій пігментів у ній, за культивування на досліджуваних середовищах при різній інтенсивності освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк.

6.4.1 Вихід біомаси та загальний вміст каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при різній інтенсивності освітленості

В зв'язку з тим, що за культивування на середовищі Рідера вихід біомаси дріжджів був таким же низьким як і на середовищі YM, а також вміст каротиноїдних пігментів був теж досить низьким, то у подальшому досліджували вплив освітленості різної інтенсивності на вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 після 5 діб росту тільки за культивування на живильних середовищах YM, BY, BYP, CM.

Було виявлено, що інтенсивність освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк по-різному впливала на вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum*

ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах (рис.27).

Вихід сухої біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5 діб культивування в темряві на середовищі з найменшою інтенсивністю росту УМ залишався практично незмінним незалежно від інтенсивності освітленості (від 300 до 5000 лк) (рис.27).

Водночас, освітленість пригнічувала накопичення біомаси дріжджів у порівнянні з ростом культури в темряві на середовищах ВУ і ВУР. На середовищі ВУ при освітленості інтенсивністю 2000 лк вихід біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 зменшився на 33% порівняно з культивуванням у темряві, й на 20% при освітленості інтенсивністю 5000 лк (рис.27). За культивування дріжджів на середовищі ВУР при освітленості інтенсивністю 750 лк вихід біомаси зменшувався на 29%, а при освітленості інтенсивністю 2000 лк й 5000 лк - на 39% та 45%, відповідно, порівняно з культивуванням у темряві (рис.27).

За культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищі СМ при освітленості інтенсивністю 750 лк вихід біомаси збільшувався на 15% порівняно з культивуванням у темряві (рис.27).

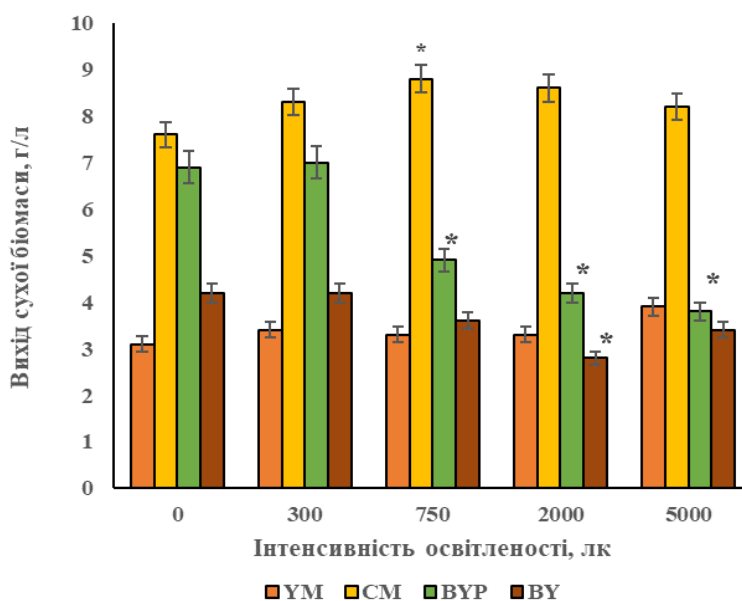


Рис. 27. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах протягом 5 діб при

різній інтенсивності освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк

*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві

Отже, освітленість різної інтенсивності пригнічувала, стимулювала або не впливала на накопичення біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 в залежності від середовища культивування. Можна вважати, що такий різноспрямований ефект освітленості вказує на те, що він забезпечував «модифікацію» або зміну складу середовища культивування, або ж надавав комплексний вплив на проліферативну активність клітин дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 і їх мікрооточення.

Однак, незалежно від механізму впливу освітленості на культури дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, досліджувані живильні середовища можна використовувати у якості моделі культур з різним виходом біомаси в дослідженні каротиногенезу.

Саме тому, на наступному етапі експериментів доцільним було визначення взаємозв'язку фотоінгібування та фотостимуляції накопичення біомаси з вмістом каротиноїдних пігментів у клітинах *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Для досягнення поставленої мети даного етапу досліджень загальний вміст каротиноїдних пігментів визначали у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5 діб культивування на досліджуваних живильних середовищах УМ, ВУР, СМ.

Виявилося, що освітленість спричиняла різний вплив на загальний вміст каротиноїдів у клітинах *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, зростаючих на середовищах УМ, ВУР, СМ (рис.28).

За культивування дріжджів на середовищі УМ освітленість призводила до зменшення вмісту загальних каротиноїдів у біомасі на 18% при освітленості інтенсивністю 300 лк і 750 лк, а при освітленості інтенсивністю 2000 лк й 5000 лк, їхня кількість зменшувалася у 2 рази порівняно з

культивуванням у темряві (рис.28). При цьому вихід біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому середовищі майже не залежав від освітленості (рис.28).

За культивування дріжджів на середовищі ВУР загальний вміст каротиноїдних пігментів навпаки збільшувався в 2,4 рази при освітленості інтенсивністю 750 лк й у 2,3 рази при освітленості інтенсивністю 2000 лк порівняно з культивуванням у темряві (рис.28). При освітленості інтенсивністю 5000 лк вміст каротеноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 був на 41% більшим, ніж за культивування у темряві (рис. 28). Водночас, освітленість не стимулювала ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому середовищі (рис.27).

Освітленість інтенсивністю 300-2000 лк не впливала на загальний вміст каротиноїдних пігментів у клітинах *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на середовищі СМ (рис.28). При інтенсивності освітленості 5000 лк вміст каротиноїдів у біомасі дріжджів був на 30% більшим, ніж за культивування у темряві на цьому середовищі (рис. 28).

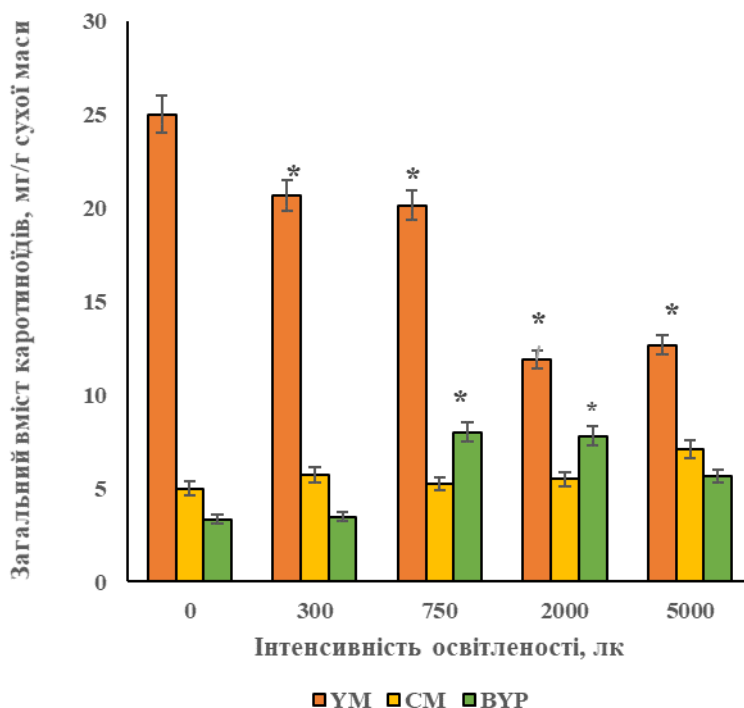


Рис. 28. Загальний вміст каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних

середовищах протягом 5 діб при різній інтенсивності освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк

*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві

Отже, освітленість інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк впливала на загальний вміст каротиноїдних пігментів у клітинах *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 по-різному, в залежності від середовища культивування, й це не було пов'язано з накопиченням біомаси в культурі дріжджів.

6.4.2 Якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при різній інтенсивності освітленості

Було встановлено, що за культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на досліджуваних живильних середовищах YM, BYP та CM освітленість не впливала на якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі (рис. 29).

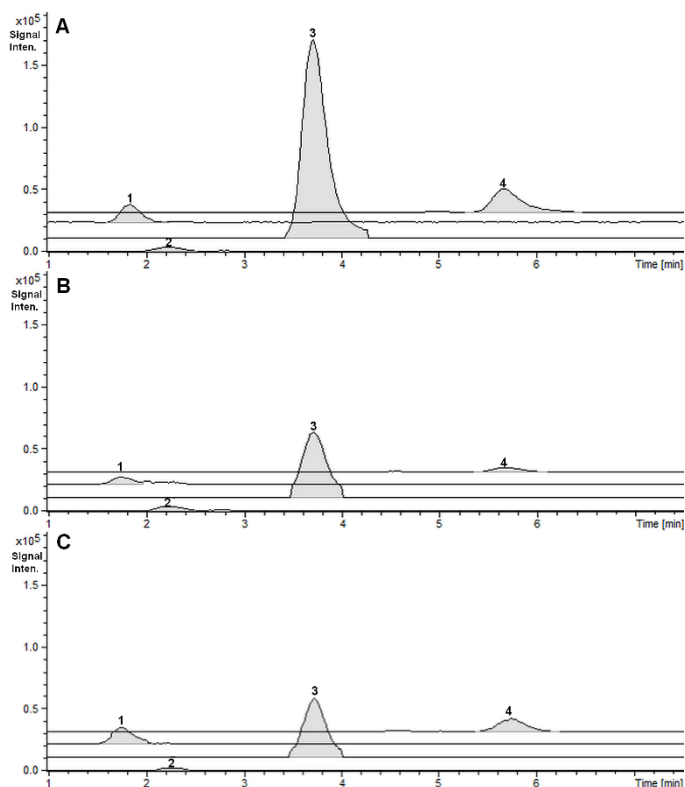


Рис. 29. Хроматограма каротиноїдного профілю, який визначали в біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при інтенсивності освітленості 750 лк: А – на середовищі YM, В – на середовищі CM, С – на середовищі BYP; 1^й пік – астаксантин ($[M]^{+} = 596.386 \text{ m/z}$; $[M + H]^{+} = 597.394 \text{ m/z}$), 2^й пік – торулородин ($[M]^{+} = 564,396 \text{ m/z}$), 3^й пік – лікопен ($[M + H]^{+} = 537.446 \text{ m/z}$), 4^й пік - β -каротин ($[M]^{+} = 536,438 \text{ m/z}$)

Водночас, кількісне співвідношення пігментів у клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах значно змінювалось в залежності від інтенсивності освітленості (рис. 30, 31, 32).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі YM при інтенсивності освітленості 300 лк у біомасі зменшувався вміст лікопену майже на 25%, незначно зменшувався вміст β -каротину та торулородину, натомість вміст астаксантину збільшувався на 30% порівняно з культивуванням у темряві (рис. 30).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ҮМ при інтенсивності освітленості 750 лк вміст лікопену та астаксантину у біомасі дріжджів був майже таким же як і за культивування у темряві, вміст β -каротину зменшувався на 40%, а вміст торулородину зменшувався майже в 3 рази порівняно з культивуванням у темряві (рис. 30).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ҮМ при інтенсивності освітленості 2000 лк вміст лікопену у біомасі дріжджів зменшувався у 2,7 разів порівняно з культивуванням у темряві, вміст β -каротину та торулородину зменшувався на 43% та 30% відповідно, натомість вміст астаксантину збільшувався на 62% порівняно з культивуванням у темряві (рис. 30).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ҮМ при інтенсивності освітленості 5000 лк вміст лікопену та β -каротину у біомасі дріжджів зменшувався майже у 2 рази порівняно з культивуванням у темряві, вміст торулородину зменшувався на 20%, а вміст астаксантину зменшувався на 14% порівняно з культивуванням у темряві (рис. 30).

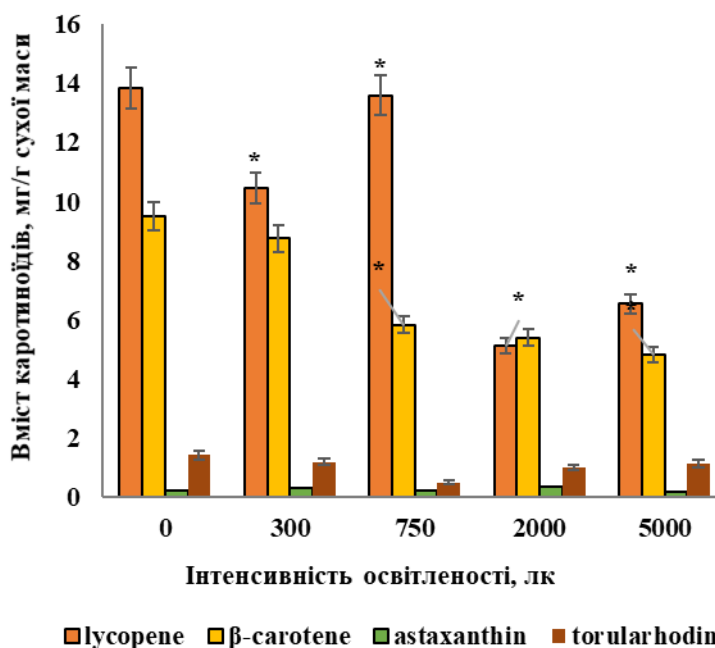


Рис. 30. Якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваному живильному середовищі ҮМ впродовж 5 діб при освітленості інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк

*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ВУР при інтенсивності освітленості 300 лк у біомасі вміст β -каротину практично не змінювався, вміст лікопену та астаксантину незначно збільшувався порівняно з культивуванням у темряві (рис. 31).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ВУР при інтенсивності освітленості 750 лк вміст лікопену збільшувався в 4 рази та астаксантину на 40%, натомість вміст β -каротину зменшувався на 25% порівняно з культивуванням у темряві (рис. 31).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ВУР при інтенсивності освітленості 2000 лк вміст лікопену у біомасі дріжджів збільшувався у 4,2 разів, вміст астаксантину збільшувався на 40%, а вміст β -каротину зменшувався в 2,4 рази порівняно з культивуванням у темряві (рис. 31).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі ВУР при інтенсивності освітленості 5000 лк вміст лікопену збільшувався лише в 2,9 разів, вміст астаксантину збільшувався на 60%, а вміст β -каротину зменшувався у 2 рази порівняно з культивуванням у темряві (рис. 31).

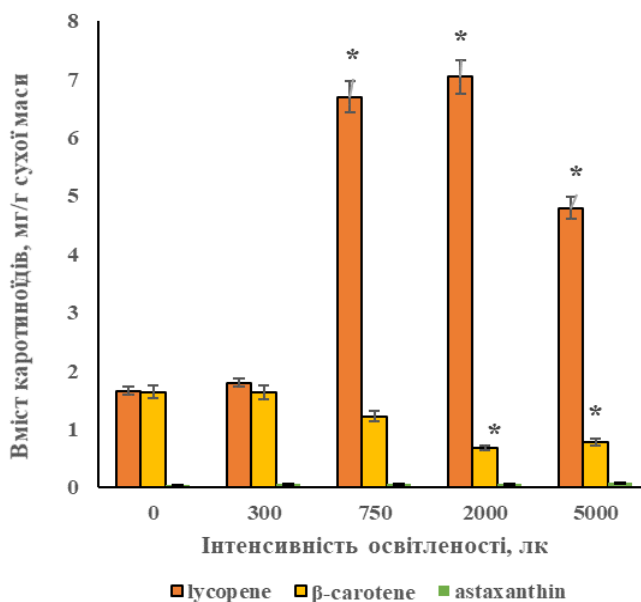


Рис. 31. Якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів

R. diobovatum IMB Y-5023 за культивування на досліджуваному живильному середовищі ВУР впродовж 5 діб при освітленості інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк

*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі СМ при інтенсивності освітленості 300 лк у біомасі збільшувався вміст лікопену майже на 29%, вміст астаксантину зменшувався на 30%, а вміст β -каротину зменшувався в 2,2 рази порівняно з культивуванням у темряві (рис. 32).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі СМ при інтенсивності освітленості 750 лк вміст лікопену у біомасі дріжджів незначно збільшувався, а вміст астаксантину та β -каротину дещо зменшувався порівняно з культивуванням у темряві (рис. 32).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі СМ при інтенсивності освітленості 2000 лк вміст лікопену у біомасі дріжджів збільшувався на 22%, вміст β -каротину зменшувався в 5,2 разів, а астаксантину на 20% порівняно з культивуванням у темряві (рис. 32).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі СМ при інтенсивності освітленості 5000 лк вміст лікопену у біомасі дріжджів збільшувався в 1,6 разів, вміст β -каротину зменшувався в 3,3 разів, а вміст астаксантину зменшувався на 30% порівняно з культивуванням у темряві (рис. 32).

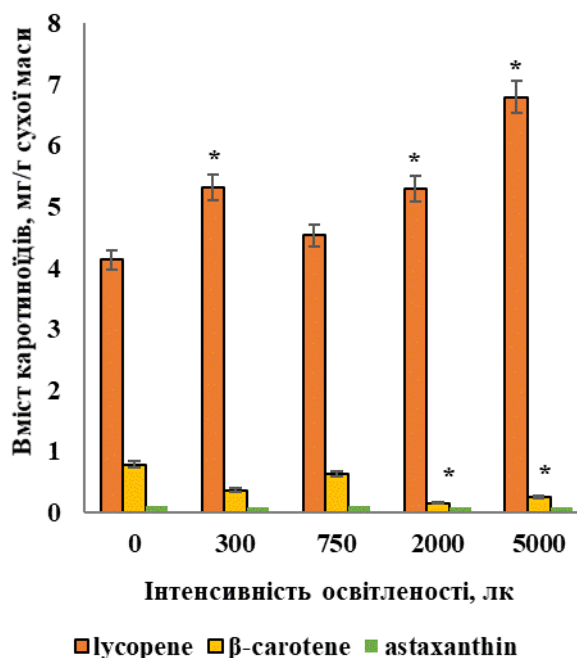


Рис. 32. Якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваному живильному середовищі СМ впродовж 5 діб при освітленості інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк

*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві

Таким чином, освітленість впливала тільки на кількісний склад каротиноїдних пігментів й не впливала на якісний у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, ефект і спрямованість цього впливу залежать від середовища та умов культивування.

Різний вплив освітленості інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк на накопичення біомаси та каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 залежно від досліджуваних живильних середовищ культивування може вказувати на те, що використані в дослідженнях органічні середовища містять у своєму складі світлочутливі компоненти, що в свою чергу призводить до неконтрольованих нами змін складу середовищ. Склад середовищ змінюється й під впливом клітин дріжджів, які не тільки споживають окремі компоненти середовища, але й виділяють у нього

екзометаболіти [170]. Все це вказує на важливість відомого факту, що клітини і культуральне середовище формують складну динамічно-гетерогенну систему. Освітленість ще в більшій мірі може змінювати склад такої складної гетерогенної системи.

Важливо відзначити, що система «клітина-середовище» може зазнавати не тільки лінійні зміни, як це видно з даних представлених на рисунках 30, 31, 32.

Дані в літературі вказують на те, що в більшості випадків світло впливає на мікробіологічний синтез каротиноїдів [38], а каротиногенез вважається основним механізмом фотозахисту в мікроорганізмах, які піддаються дії сонячного ультрафіолетового випромінювання (290-400 нм), що генерує реактивні форми кисню на клітинному рівні [171]. Як правило, світло стимулює зростання клітин та синтез каротиноїдних пігментів, наприклад, у таких дріжджів як *Rh. glutinis* [172] та *X. dendrorhous* [173]. У мікроводоростей *Haematococcus pluvialis* світло також є необхідним чинником для індукції синтезу астаксантину [21]. Однак стимулююча роль, яку відіграє інтенсивність освітлення, залежить від мікроорганізму, складу живильного середовища та параметрів культивування. Випадки пригнічення каротиногенезу світлом також відомі, наприклад, у *Trichophyton mentagrophytes* та *Blakeslea trispora* [98]. Крім того, дуже висока інтенсивність освітлення навіть може призвести до загибелі клітин [23]. Вплив світла на каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 не був вивчений раніше, хоча як вже описано вище, відомо, що вони зустрічаються в різноманітних природних середовищах з різним рівнем освітленості [169].

У результаті проведених нами досліджень було встановлено, що дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 ефективно синтезували каротиноїди в широкому діапазоні інтенсивності освітленості, в тому числі й у темряві, незалежно від живильного середовища. Найбільшу кількість пігментів отримували в культурах за культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі YM, збагаченого олігосахаридами, незалежно від інтенсивності

освітленості. Найбільший вихід каротиноїдів (24,98 мг/г сухої біомаси) був отриманий за культивування дріжджів на цьому середовищі в темряві. На сьогоднішній день це найбільший вихід пігментів, отриманий для дріжджів *R. diobovatum*. Таким чином, можна зробити висновок, що в наших дослідженнях каротиногенез *R. diobovatum* IMB Y-5023 залежав від складу живильного середовища й, на нашу думку, переважно від вихідної концентрації вуглеводів у середовищі.

Оскільки за культивування на середовищах YM, BYP та CM освітленість інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк у більшості випадків не впливала на ріст та синтез каротиноїдних пігментів дріжджів або пригнічувала їх, то звідси слідує, що культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 можна здійснювати в темряві. Це може бути пов'язано з тим, що в природних популяціях *R. diobovatum* IMB Y-5023 часто зустрічаються у досить екстремальних умовах, наприклад у жолобах океанів на великій глибині, де дуже мало або зовсім не має сонячного світла. В зв'язку з цим можна зробити висновок, що у клітинах дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 фотопротекторна функція каротиноїдів не являється головною функцією цих пігментів.

Крім того, різноманітні ефекти інтенсивності освітлення на накопичення каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на різних середовищах вказують про можливість впливу на активність ферментів, що беруть участь у каротиногенезі. Наші спостереження були подібними до результатів досліджень Zhang та співавторів (2014), які повідомили, що зміна температури та світла може пригнічувати деякі ферменти, які беруть участь у синтезі каротиноїдних пігментів.

6.4.3 Аналіз отриманих результатів з використанням статистичних методів

Для додаткового аналізу та інтерпретації описаних вище результатів були використані статистичні методи.

Кластерний аналіз був застосований для пошуку структур серед отриманих даних. Вивчено подібність кількісних сум і якісних пропорцій каротиноїдів (рис.33). Метод Варда був використаний як правило об'єднання: цей метод мінімізує суму квадратів (СС) гіпотетичних кластерів, які можуть бути створені на кожному етапі аналізу. Евклідова відстань (віддаль між двома точками) була розрахована для відображення геометричної відстані в багатовимірному просторі [142], тобто простір, який створюється профілем каротиноїдів у кожному зразку. Аналіз ієрархічних дерев (ієрархічна кластеризація) показав, що можна виділити два подібних кластера, вирізаючи діаграму дерева на 40% від довшої евклідової відстані (D_{max}). Аналіз дендрограми показав вплив вибору середовища на каротиноїдний профіль (рис. 33).

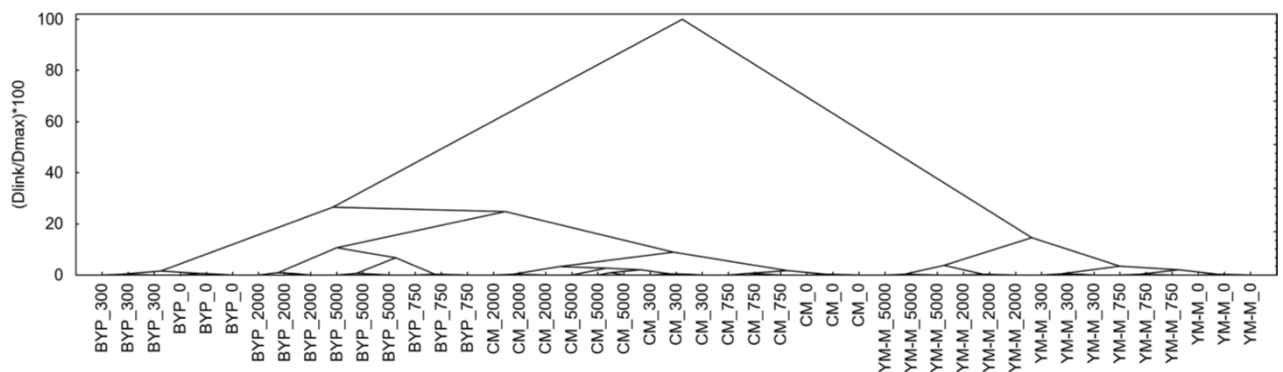


Рис. 33. Результати кластерного аналізу для виходу загальних каротиноїдів та їх якісних пропорцій у культурах *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах (YM, CM, BYR) при різній інтенсивності освітленості (0; 300; 750; 2000 і 5000; лк). Правило об'єднання: метод Варда, метрика відстані: евклідові відстані (віддалі між двома точками)

Таким чином, склад досліджуваних середовищ суттєво вплинув на вихід біомаси та каротиноїдів, а також на їх якісні пропорції (рис. 27, 28, 29, 31, 32, 33). Коефіцієнт кореляції Спірмена показав, що між виходом біомаси та накопиченням каротиноїдів у культурах *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 була відсутня суттєва кореляція за культивування дріжджів у темряві, $p > 0,05$ (табл. 7). У цьому випадку склад живильного середовища відігравав вирішальну роль.

Коефіцієнт кореляції Спірмена був розрахований для отриманих результатів (табл. 7). Показано, що освітленість мала низький, незначний вплив ($p > 0,05$) на вміст β -каротину. Крім того, була виявлена негативна кореляція між накопиченням каротиноїдів та продуктивністю біомаси, $p < 0,05$.

Таблиця 7

Коефіцієнти кореляції Спірмена для змінних у культурах *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах та при різній інтенсивності освітленості (0-5000 лк); кореляції значущі при $p < 0,05$

Змінні	Вихід біомаси	Загальні каротеноїди	Лікопен	β -каротин	Астаксантин	Торулоролдин	Освітленість
Вихід біомаси	1						
Загальні каротеноїди	-0,7156	1					
Лікопен	-0,5151	0,9294	1				
β -каротин	-0,8410	0,5417		1			
Астаксантин	-0,4803	0,6612	0,4758	0,5816	1	0,7996	
Торулоролдин	-	0,7600	0,537	0,820		1	

дин	0,751 9		2	0			
Освітленість				— 0,325 5			1

Алгоритм кластеризації методом k -середніх був застосований для виявлення кластерів у зразках і для призначення цих зразків кластерам. Кластерний аналіз (кластеринг дерев) сильно відрізняється від алгоритму кластеризації методом k -середніх, який обчислює k кластери. Цей метод мінімізує мінливість всередині кожного кластера, одночасно максимізуючи мінливість між кластерами. Оптимальна кількість кластерів (невідома зазделегідь і потребує обчислення) визначалася за допомогою алгоритму перехресної перевірки V -складання, що дозволяє автоматично обчислити найбільш вірогідну кількість кластерів отриманих даних. Дисперсійний аналіз (ANOVA) для безперервних змінних та критерію хі-квадрат категорійних змінних були проведені, щоб оцінити найбільш дискримінантні змінні [142]. Встановлено, що вихід біомаси, загальних каротиноїдів, лікопену, β -каротину, астаксантину, торулородину, освітленість та змінні середовища росту мають дискримінантну силу ($p < 0,001$). Алгоритм згенерував чотири кластери (табл. 8), які являються однорідними по відношенню до живильного середовища, за винятком зразків, отриманих за культивування дріжджів на середовищі YM. Це показує, що лише склад живильного середовища визначає кількість та якісний склад каротиноїдів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Таблиця 8

Результати кластеризації методом k -середніх: остаточна класифікація зразків у культурах *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах та при різній інтенсивності освітленості (0-5000 лк), що визначили чотири кластери за алгоритмом перехресної перевірки V -складання ^a

Освітленість (лк)	0	300	750	2000	5000
Живильне середовище	Кінцева класифікація				
УМ	1	1	1	2	2
ВУР	3	3	3	3	3
СМ	4	4	4	4	4

^aВстановлені змінні з дискримінантною силою ($P < 0,0001$): вихід біомаси, загальні каротиноїди, лікопен, β -каротин, астаксантин, торулоридин, освітленість, живильне середовище.

Метод головних компонент (МГК) був використаний для узагальнення описаної вище взаємозалежності між змінними та їх впливом на класифікацію даних. Ця процедура перетворює дані на нові змінні (головні компоненти, ГК), які не мають лінійної кореляції і пояснюють найбільшу дисперсію вихідних даних. Змінні з дискримінантною силою (обчислені за процедурою алгоритму кластеризації методом k -середніх, $p < 0,001$) були використані для МГК (рис.34а). Введено три нові змінні (головні компоненти, ГК); ці ГК пояснюють 90,2% дисперсії даних. Чотири групи відрізнялися методом аналізу k -середніх (рис. 34б). Було визначено, що параметри для цих груп, безумовно, різні. Одночасне порівняння графіка завантаження (рис.34а) з відповідним графіком оцінки (рис.34б) полегшує виявлення взаємозв'язків між зразками та змінними. Напрямки векторів на рисунках 34а та 34б повинні мати на увазі: якщо позиція зразка збігається з напрямком вектора, то можна припустити, що концентрація цього компонента (змінної) є достатньою в цьому зразку. Було встановлено, що положення кожного кластеру (рис. 34б) визначається живильним середовищем росту дріжджів. Кореляції можна пояснити від косинуса кута між векторами (рис.34а), наприклад: $\cos(0^\circ) = 1$, $\cos(90^\circ) = 0$, $\cos(180^\circ) = -1$. Вектор освітленості ортогональний або слабо співвіднесений з іншими

векторами. МГК підтвердив негативну кореляцію між виходом біомаси дріжджів і концентрацією каротиноїдів, також МГК свідчить про те, що середовище YM являється найбільш ефективним для накопичення каротиноїдів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

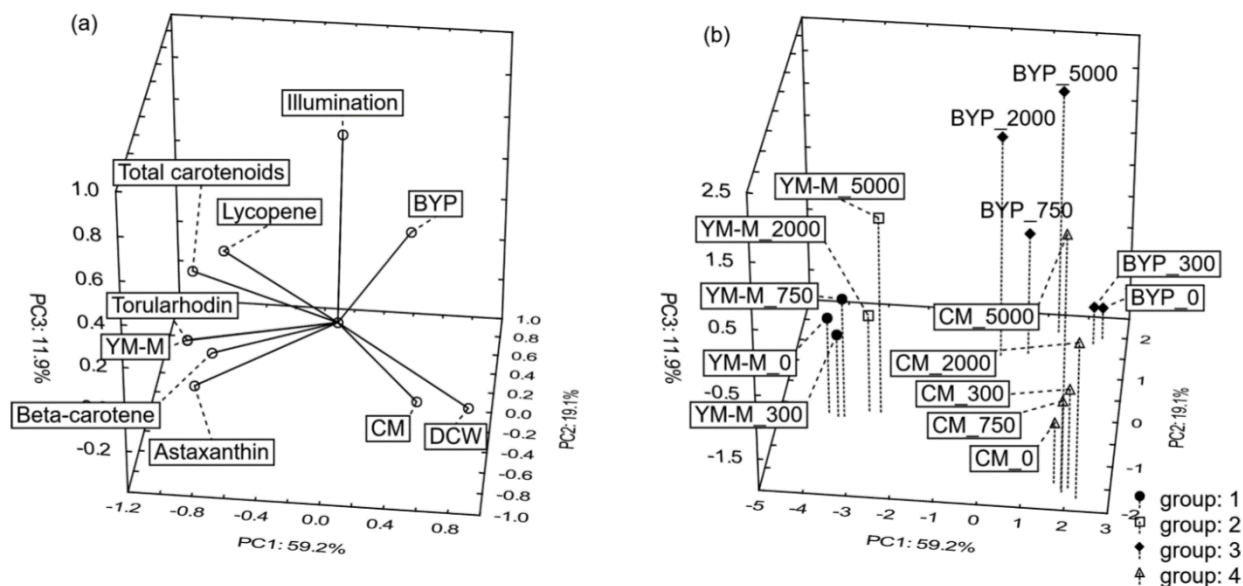


Рис. 34. Тривимірний графік, що відображає МГК завантаженого графіка (а) та графіка оцінки (б) для зразків, отриманих з культур *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на живильних середовищах YM, CM та BYP при різній інтенсивності освітленості (лк) (0; 300, 750, 2000 і 5000), кластери були визначені методом кластеризації k-середніх за допомогою алгоритму перехресної перевірки V-складання

Таким чином, проведений аналіз статистичними методами підтвердив той факт, що в наших дослідженнях на ріст та синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 головним чином впливав склад живильних середовищ.

6.5 Вивчення впливу складу досліджуваних живильних середовищ на ріст та синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023

Оскільки на попередньому етапі досліджень було встановлено, що на

вихід біомаси та каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 головним чином впливав склад живильних середовищ, то метою даного етапу досліджень було визначення складу живильних середовищ, а також вивчення взаємозв'язку між ним та параметрами життєдіяльності дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Як вже було описано раніше, на ріст і каротиногенез дріжджів можуть впливати багато чинників: температура, рН, аерація, світло, також природа і концентрація джерел вуглецю, азоту, мінеральних речовин, вітамінів [73]. Природа і концентрація джерел вуглецю являються одним з головних лімітуючих чинників не тільки для росту клітин дріжджів [174], але й для синтезу каротиноїдів. Це пов'язано з тим, що біосинтез каротиноїдів регулюється різними рівнями і активністю ферментів, які беруть участь у повному метаболізмі вуглецю через систему синтезу каротиноїдів [38].

R. diobovatum здатні засвоювати наступні джерела вуглецю: глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, целобіозу, трегалозу, рафінозу, інулін, ксилозу, арабінозу, d-рибозу, етанол і гліцерин [30]. Дріжджі *R. diobovatum* можуть рости не тільки в різних живильних середовищах, а й при різних умовах навколишнього середовища [169]. У зв'язку з цим становить інтерес дослідити вплив різного складу живильних середовищ на вихід біомаси та вміст каротиноїдів у ній, за культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 при різній інтенсивності освітленості.

Дослідження здатності дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 рости й накопичувати каротиноїди на середовищах з різним складом цукрів і, зокрема, на середовищах з низьким вмістом моносахаридів також становить великий теоретичний і практичний інтерес. Це може дозволити розширити діапазон різних органічних відходів, що можуть бути використані в якості субстратів для культивування дріжджів.

Необхідно відзначити, що моносахариди легко засвоюються клітинами дріжджів [50]. Деякі види дріжджів здатні засвоювати й полісахариди, зокрема поліфруктозани (інулін) [30], полігалактоуроніди (пектини), геміцелюлози (ксилан). У дріжджів практично відсутня здатність до розщеплення β -глюкозидних зв'язків целюлози [51]. Також відомо, що деякі

види дріжджів здатні виділяти в середовище екзополісахариди або інші вуглеводи в процесі росту. Зокрема до таких видів відносяться каротинсинтезуючі дріжджі *Rhodotorula glutinis* КСТС 7989 [170].

Ефективність засвоєння вуглеводів для окремих видів і навіть штамів дріжджів може бути різною [175, 176]. Водночас, ефективність перетворення вихідного вуглецю в біомасу і метаболіти дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 досліджені недостатньо.

Саме тому у цьому розділі досліджували вплив концентрації вуглеводів та складу живильних середовищ УМ, ВУР, СМ на вихід біомаси й синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, за їх культивування в темряві й при освітленості різної інтенсивності (в діапазоні 300 - 5000 лк). Вуглеводний склад живильних середовищ визначали до та після росту *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

6.5.1 Визначення вихідного вуглеводного складу живильних середовищ УМ, ВУР, СМ до культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 та після 5 діб росту у темряві та при різній інтенсивності освітленості

Загальний вміст вуглеводів у трьох досліджуваних живильних середовищах був різним. Таким чином, середовище УМ містило в три рази більше цукрів, ніж середовище СМ, і в 4 рази більше, ніж середовище ВУР (табл. 9). Визначення вихідного вмісту моно- та олігосахаридів у середовищах до внесення культури дріжджів показало, що всі три середовища не містили ксилози, рибози, арабінози та галактози (табл. 9). Склад цукрів у середовищі УМ був досить різноманітним й містив велику кількість трисахаридів (68,3%) та глюкози (22%), а також дисахариди, тетрасахариди, пента- та гексасахариди в невеликих кількостях (табл. 9). У середовищі ВУР містилося кілька моносахаридів: глюкоза (2,95%) та фруктоза (0,09%). Більша частина цукрів була представлена трисахаридами (82,9%) і тетрасахаридами (11,9%) (табл. 9). Живильне середовище СМ виявилось досить однорідним у своєму складі, й у більшості містило

моносахариди глюкозу (66,5%) та фруктозу (14,4% від загальної кількості цукрів), а також дисахариди (18%) (табл. 9).

Таблиця 9

**Вміст моно- та олігосахаридів у вихідних досліджуваних
живильних середовищах до культивування дріжджів
R. diobovatum IMB Y-5023, г / л**

Вміст цукрів*, г/л	Досліджуване середовище		
	УМ	СМ	ВУР
ДП2	1,30±0,06	2,83±0,14	0,16±0,01
ДП 3	32,33±1,61	0,04±0,00	9,25±0,43
ДП 4	2,96±0,14	Сліди	1,33±0,06
ДП 5	0,11±0,00	0,00	0,08±0,00
ДП 6	Сліди	0,00	0,01±0,00
Арабіноза	0,00	0,00	0,00
Фруктоза	Сліди	2,17±0,10	Сліди
Галактоза	0,00	0,00	0,00
Глюкоза	10,60±0,53	10,00±0,47	0,33±0,01
Рибоза	0,00	0,00	0,00
Ксилоза	0,00	0,00	0,00
Всього	47,30±2,35	15,04±0,72	11,16±0,51

*ДП2 - дисахариди; ДП3 - трисахариди; ДП4 - тетрасахариди; ДП5 - пентасахариди; ДП6 - гексасахариди.

Визначення загальної кількості цукрів (табл. 10), що містилася після 5 діб культивування дріжджів у темряві на різних живильних середовищах, показало, що в середовищі УМ містилося набагато більше цукрів, ніж у середовищах ВУР та СМ. Середовище ВУР містило найменшу їх кількість (табл. 10). Після 5 діб культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 у темряві на середовищі УМ, вміст усіх фракцій цукрів зменшився в кілька разів (табл. 10). Культивування дріжджів протягом 5 діб у темряві на середовищі ВУР супроводжувалося майже повним споживанням доступних цукрів (табл. 10). Зростання *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі СМ протягом 5 днів у темряві супроводжувалося споживанням усієї кількості глюкози та

зменшенням вмісту фруктози в 21,7 рази, а також дисахаридів у 8,5 рази. Загальний вміст цукрів зменшився в 29,5 разів. Водночас, вміст трисахаридів і тетрасахаридів збільшився, хоча абсолютна кількість цих олігосахаридів була дуже низькою (табл. 10).

Слід зазначити, що освітленість інтенсивністю 300-5000 лк майже не впливала на споживання різних фракцій цукрів клітинами *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на досліджуваних живильних середовищах порівняно з аналогічним культивуванням у темряві (табл. 9; 10).

Таблиця 10

Вміст моно- та олігосахаридів у досліджуваних живильних середовищах після 5 діб культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у темряві (0 лк) й при освітленості різної інтенсивності в діапазоні 300-5000 лк, г/л

Інтенсивність освітленості, лк	Вміст цукрів* у середовищі YM, г/л								
	Глк	Фру	Риб	ДП2	ДП3	ДП4	ДП5	ДП6	ΣS
0	сліди	0,00	сліди	0,01± 0,00	0,55± 0,02	0,09± 0,00	сліди	сліди	0,65± 0,03
300	0,01± 0,00	сліди	сліди	0,03± 0,00	0,41± 0,01	0,03± 0,00	сліди	сліди	0,47± 0,02
750	сліди	сліди	сліди	0,05± 0,00	0,37± 0,01	2,24± 0,09	0,07± 0,00	сліди	2,73± 0,11
2000	сліди	0,00	сліди	0,06± 0,00	0,44± 0,01	0,12± 0,00	сліди	сліди	0,63± 0,03
5000	сліди	сліди	сліди	0,05± 0,00	0,39± 0,01	0,28± 0,01	сліди	сліди	0,72± 0,03
Інтенсивність освітленості, лк	Вміст цукрів * у середовищі CM, г/л								
	Глк	Фру	Риб	ДП2	ДП3	ДП4	ДП5	ДП6	ΣS
0	0,00	0,10± 0,00	сліди	0,33± 0,01	0,08± 0,00	сліди	сліди	сліди	0,51± 0,02
300	0,00	0,03± 0,00	сліди	0,43± 0,01	0,03± 0,00	сліди	сліди	сліди	0,49± 0,02
750	1,21± 0,05	0,04± 0,00	0,00	0,77± 0,02	0,04± 0,00	сліди	сліди	0,00	2,06± 0,10
2000	0,00	сліди	сліди	0,56± 0,02	0,06± 0,00	сліди	сліди	сліди	0,62± 0,03
5000	0,00	0,00	сліди	0,33± 0,01	0,03± 0,00	сліди	сліди	сліди	0,36± 0,01

Інтенсив ність освітлен ості, лк	Вміст цукрів * у середовищі ВУР, г/л								
	Глк	Фру	Риб	ДП2	ДП3	ДП4	ДП5	ДП6	ΣS
0	0,00	0,00	сліди	0,00	0,03±0,0 0,00	сліди	0,00	0,00	0,03± 0,00
300	сліди	0,00	0,00	0,00	Сліди	0,00	0,00	0,00	сліди
750	0,00	0,00	0,00	0,00	Сліди	0,00	0,00	0,00	сліди
2000	0,00	0,00	сліди	сліди	Сліди	сліди	0,00	0,00	сліди
5000	0,00	0,00	0,00	сліди	Сліди	сліди	0,00	0,00	сліди

* Глк - глюкоза; Фру - фруктоза; Риб - рибоза; ДП2 - дисахариди; ДП3 - трисахариди; ДП4 - тетрасахариди; ДП5 - пентасахариди; ДП6 - гексасахариди, ΣS - загальний вміст цукрів.

6.5.2 Ефективність перетворення спожитих цукрів клітинами дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у біомасу та каротиноїди за їх культивування на досліджуваних живильних середовищах у темряві та при освітленості з різною інтенсивністю

Культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищі УМ протягом 5 діб (досягнення стаціонарної фази росту) супроводжувалося накопиченням невеликої кількості біомаси, незалежно від того, чи культивування здійснювалося у темряві, чи при різній інтенсивності освітленості (рис. 27). Незважаючи на споживання значної загальної кількості цукрів, що містилася в цьому середовищі, ефективність перетворення спожитого цукру в біомасу була досить низькою (табл. 11).

Культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищі ВУР у темряві дозволило отримати в 2,2 рази більше біомаси порівняно з середовищем УМ. Ефективність перетворення споживаних цукрів у біомасу за культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 у темряві була найвищою на середовищі ВУР порівняно з іншими середовищами, а світленість інтенсивністю 750-5000 лк значно знижувало її на цьому середовищі (табл. 11).

Водночас, культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищі СМ дозволило одержати в 2,5 рази більше біомаси порівняно з середовищем УМ

при тих же умовах у темряві (рис. 27). Ефективність перетворення спожитих цукрів у біомасу за культивування дріжджів на середовищі СМ була в декілька разів вищою порівняно з середовищем УМ (табл. 11).

Культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на живильних середовищах УМ, ВУР та СМ супроводжувалося різною ефективністю перетворення спожитих цукрів у каротиноїдні пігменти (табл. 11). Ефективність перетворення спожитих цукрів у каротиноїди за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищі УМ у темряві, була досить високою, але інтенсивність освітленості 300-5000 лк значно знижувала цю ефективність (табл. 11).

Водночас, за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 у темряві на середовищі ВУР ефективність перетворення спожитих цукрів у каротиноїди була в 1,8 рази нижче, ніж на середовищі УМ (табл. 11). Інтенсивність освітленості 750 лк і 2000 лк збільшувала таку ефективність (табл. 11).

За культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 у темряві на середовищі СМ ефективність перетворення спожитих цукрів у каротеноїди була набагато нижче порівняно з середовищем УМ, а освітленість різної інтенсивності майже не впливала на неї. (табл. 11).

Слід зазначити, що освітленість практично не вплинула на кількість спожитого загального цукру за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на всіх трьох живильних середовищах, але по-різному впливала на вихід біомаси дріжджів, на кількість загальних каротиноїдів і, відповідно, на ефективність перетворення спожитого субстрату на ці параметри (рис. 27; 28; табл. 11). Невідповідність між споживанням загальних цукрів клітинами дріжджів або різною ефективністю перетворення цукрів на біомасу та пігменти *R. diobovatum* ІМВ У-5023 може пояснюватися в першу чергу різним якісним складом цукрів у досліджуваних середовищах. Також можна припустити, що така різниця в ефективності споживання цукрів та виходом біомаси дріжджів, накопиченням каротиноїдів пов'язана з впливом інших компонентів живильного середовища та з різною метаболічною направленістю клітин *R. diobovatum* ІМВ У-5023 за культивування на цих середовищах.

Відомо, що реакція грибів на світло залежить від джерела вуглецю у середовищі [177, 106]. Хоча світло й вважається основним тригерним фактором багатьох метаболічних процесів грибів, зокрема, синтезу каротиноїдів, але також було показано, що деякі метаболічні процеси в першу чергу залежать від джерел вуглецю, а світло являється лише каталізуючим фактором [174].

Таблиця 11

Кількість спожитих цукрів, коефіцієнт ефективності їх перетворення у каротиноїди та біомасу за культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищах УМ, ВУР, СМ протягом 5 діб у темряві та при різній інтенсивності освітленості (300-5000 лк)

Живильне середовище	Інтенсивність освітленості, лк	Кількість спожитих цукрів, %	Коефіцієнт ефективності перетворення спожитих цукрів у біомасу, $Y_{X/S}$ (г/г)	Коефіцієнт ефективності перетворення спожитих цукрів у каротиноїди, $Y_{C/S}$ (мг/г)
УМ	0	98,6	0,07	0,54
	300	99	0,07	0,44
	750	94,2	0,07	0,45
	2000	98,7	0,07	0,25
	5000	98,5	0,08	0,27
ВУР	0	97,2	0,62	0,30
	300	100	0,63	0,31
	750	100	0,44	0,75
	2000	100	0,38	0,68
	5000	100	0,34	0,51
СМ	0	96,6	0,52	0,34
	300	96,7	0,57	0,39
	750	86,3	0,68	0,40
	2000	95,9	0,60	0,38
	5000	97,6	0,56	0,48

6.5.3 Вуглецево-азотний (C/ N) баланс живильних середовищ YM, BYP, CM та його взаємозв'язок з виходом біомаси та синтезом каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023

Найбільше накопичення каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023 (24,98 мг/г біомаси) було встановлено в культурі дріжджів після культивування на середовищі YM, яке мало початкове співвідношення вуглецево-азотного балансу C/N 12 і забезпечувало найнижчий вихід біомаси. У цьому випадку обчислений об'ємний вихід каротиноїдів був дуже високим у порівнянні з іншими середовищами й становив 77 мг/л за рахунок великої кількості пігментів у біомаси.

Культура дріжджів після росту на середовищі BYP, співвідношення вуглецево-азотного балансу C/N якого становило 10, характеризувалася відносно високим виходом біомаси, але вміст каротиноїдів був найнижчим - 3,35 мг/г сухої маси, що означало в 3,3 рази нижчий (23 мг/л) обчислений об'ємний вихід синтезованих пігментів у порівнянні з живильним середовищем YM. Проте низький вміст каротиноїдів у поєднанні з високим виходом біомаси також був виявлений за культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі CM, співвідношення вуглецево-азотного балансу C/N якого становило 0,86.

Серед чинників, що впливають на метаболізм клітин мікроорганізмів, які здатні синтезувати й накопичувати в своїй біомасі досить велику кількість ліпідів, у тому числі й дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, співвідношення C/N відіграє важливу роль. Високе співвідношення C/N стимулює синтез й накопичення ліпідів, а каротиноїди синтезуються у великій кількості при низькому співвідношенні C/N. Ацетил-КоА являється прекурсором як жирних кислот, так і каротиноїдів (ці всі речовини синтезуються через мевалонатний шлях), й, мабуть, є основним джерелом синтезу великої кількості цих сполук у клітинах дріжджів. Було висловлено припущення, що при високому співвідношенні C/N надлишки С, АТФ та НАДФН, утворені

внаслідок обмеженого синтезу білка, використовуються дріжджами для отримання каротиноїдів та жирних кислот. Проте накопичення каротиноїдів зазвичай відбувається на пізнішій стаціонарній фазі після закінчення росту, тоді як формування ліпідів завжди починається на початку логарифмічної фази [58]. Згідно з літературними даними, співвідношення C/N, яке перевищує 20, зазвичай розглядається як необхідна умова для індукції ліпідів у мікроорганізмів, що їх синтезують [58]. У наших експериментах початкове співвідношення C/N всіх досліджуваних середовищ було менше 20; хоча ми й не визначили кількість ліпідів, але ми спостерігали відмінності виходу пігментів та біомаси.

З огляду на дані літератури, слід наголосити, що в наших експериментах було отримано значно більшу кількість каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023, незалежно від складу досліджуваного живильного середовища або інтенсивності освітленості. Yurkov та співавтори (2008), культивуючи 11 штамів дріжджів *R. diobovatum* на середовищі, що містило 110 г/л глюкози (в наших дослідженнях концентрація цукрів у живильних середовищах була в 2-5 разів нижче), отримали майже в вісім разів більше виходу біомаси, ніж було отримано за культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 на середовищі CM, яке забезпечувало найбільший вихід біомаси (рис. 27). Водночас, кількість каротиноїдних пігментів була в 4-40 разів менше, ніж їх кількість на живильних середовищах у нашому дослідженні. Однак, аналіз складу середовища, використаного Yurkov та співавторами (2008) вказує на те, що співвідношення C/N у ньому було дуже високим, а при високій концентрації цукрів могли синтезуватися ліпіди. Під час росту клітин очікується, що відношення C/N змінюватиметься внаслідок споживання азоту, таким чином ацетил-КоА доступний на більш ранній стадії для біосинтезу ліпідів; після його вичерпання біосинтез каротиноїдів на більш пізній стаціонарній фазі росту буде обмежений [58].

6.5.4 Багатовимірний аналіз результатів

Кластерний аналіз (КА) та метод головних компонент (МГК) були застосовані для того, щоб проілюструвати загальний взаємозв'язок між цукрами, що містилися у досліджуваних живильних середовищах, біомасою та каротиноїдами після 5 діб культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на досліджуваних живильних середовищах.

Подібність між зразками згідно з параметрами, наведеними у таблиці 10, 11 та на рисунках 27, 28 була досліджена як результат КА (рис. 35).

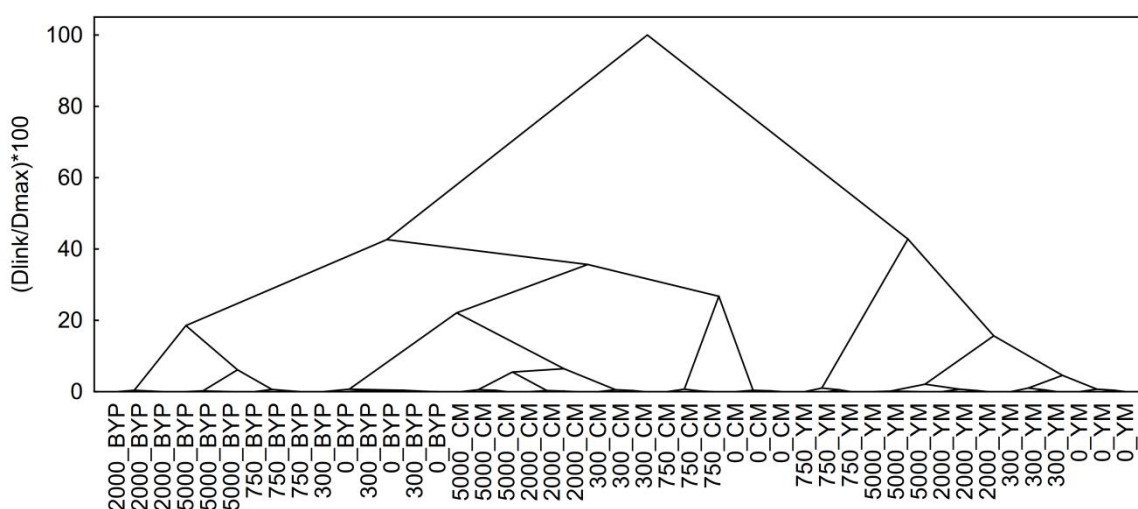


Рис. 35. Результати кластерного аналізу, подібність *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5-денного культивування на середовищах YM, BYP, CM при різній інтенсивності освітленості (0-5000 лк) за параметрами, наведеними у табл. 10, 11 та на рис. 27, 28. Правило об'єднання: метод Варда, метрика відстані: евклідові відстані (віддалі між двома точками)

Параметри дріжджів були абсолютно іншими на середовищі YM порівняно з середовищами BYP та CM. Підсумовуючи можна зробити висновок, що середовища BYP та CM мали подібний вплив на *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. Результати МГК (рис. 36) дозволяють спостерігати залежність між змінними та їх впливом на конкретні зразки. Зрозуміло, що найвища концентрація каротиноїдів була пов'язана з високим рівнем споживання цукру. Однак перетворення спожитих цукрів у біомасу було найбільш ефективним за культивування дріжджів на середовищі CM, але ефективність

перетворення спожитих цукрів у каротиноїди була найвищою на середовищі ВУР при високій інтенсивності освітлення.

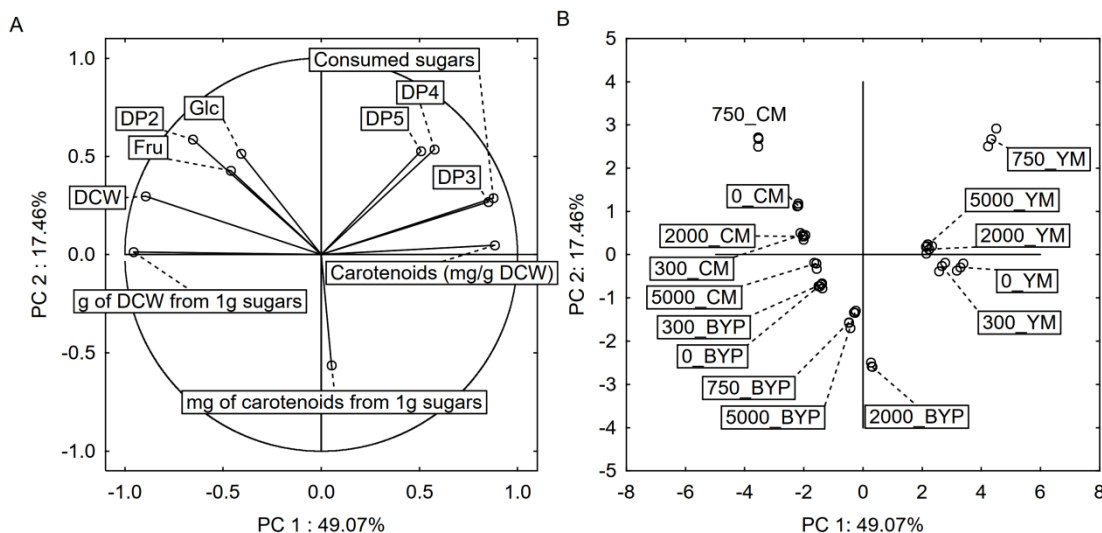


Рис. 36. Графік, що відображає МГК завантаженого графіка (а) та графіка оцінки (б) для зразків, отриманих з культур *R. diobovatum* ІМВ У-5023 після культивування на живильних середовищах УМ, СМ та ВУР при різних інтенсивності освітленості (лк) (0; 300, 750, 2000 і 5000), за параметрами, наведеними у табл. 10, 11 та на рис. 27, 28

6.5.5 Кореляція між кількістю спожитих фракцій цукрів та накопиченням біомаси й каротиноїдами дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 за їх культивування на середовищах УМ, ВУР, СМ при освітленості з різною інтенсивністю

Кореляція визначалась між кількістю спожитих фракцій моно- та олігосахаридів досліджуваних середовищ УМ, СМ, ВУР та виходом біомаси, а також кількістю та складом каротиноїдів за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 в темряві та при інтенсивності освітленості 300-5000 лк. Для цього було використано метод кореляції Спірмена (табл. 12).

За культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищах УМ та ВУР, спостерігався пряма кореляція між кількістю β -каротину та кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів та пентасахаридів, а також між

кількістю лікопену та кількістю спожитих пентасахаридів (табл. 12). На середовищі УМ спостерігалася також пряма кореляція між кількістю торулородина та кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів, пентасахаридів та гексасахаридів, між виходом біомаси та кількістю спожитих трисахаридів (табл. 12). На середовищі ВУР також спостерігалася пряма кореляція між кількістю β -каротину та кількістю спожитих гексасахаридів, між кількістю астаксантину та кількістю спожитих трисахаридів, пентасахаридів та гексасахаридів (табл. 12). Обернена кореляція спостерігалась на середовищах УМ та ВУР між кількістю β -каротину та кількістю спожитої глюкози, а на середовищі ВУР також між виходом біомаси та кількістю спожитої глюкози (табл. 12).

Було встановлено, що за культивування *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на середовищі СМ, спостерігається досить сильна пряма кореляція між: кількістю загальних каротиноїдів та кількістю спожитої глюкози, фруктози, дисахаридів та трисахаридів; кількістю лікопена та кількістю спожитої фруктози, глюкози (табл. 12).

На підставі отриманих результатів, можна зробити висновок, що глюкоза не являється основним необхідним джерелом вуглецю для росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023.

Таблиця 12

Коефіцієнт кореляції Спірмена між кількістю спожитих фракцій цукрів та накопиченням біомаси й каротиноїдами дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 за їх культивування на середовищах УМ, ВУР, СМ при освітленості інтенсивністю в діапазоні 0-5000 лк. Представлені кореляції значущі при $p < 0,05$

Коефіцієнт кореляції Спірмена (r_s) для живильного середовища УМ*									
	Глк	Фру	ДП2	ДП3	ДП4	ДП5	ДП6	ΣC	ΣS
Вихід								-	
біомаси	0,375	-0,125	0,495	0,575		-0,350	0,300	0,375	
Загальні	-0,600	-0,125	0,790	0,300	0,500	0,650	0,250		
каротиноїди									0,100
β -каротин	-0,800	0,275	0,825	-0,650	0,600	0,725	-0,300		0,300

Астаксантин	-0,700	0,625	-0,125	-0,600	-0,300	0,425	-0,300	0,800	
Лікопен	-0,100	0,125	0,825	-0,100	0,100	0,500		-	
								0,300	
Торулородин	-0,600	0,325	0,825	-0,700	0,800	0,950	0,750	0,500	
Коефіцієнт кореляції Спірмена (r_s) для живильного середовища ВУР*									
	Глк	Фру	ДП2	ДП3	ДП4	ДП5	ДП6	ΣC	ΣS
Вихід								-	
біомаси	-0,675	0,525	0,750	0,175	0,450	0,475	0,475	0,675	0,175
Загальні	0,800	0,500	0,250	0,425	0,125	0,500	0,500		
каротиноїди									0,750
β -каротин	-0,600	0,500	0,875	-0,200	0,650	0,500	0,500		-
									0,250
Астаксантин	0,275	0,525	0,275	0,800	0,450	0,525	0,525		0,650
Лікопен	0,800	0,500	-0,300	0,425	0,500	0,800	0,500		0,750
Торулородин	-	-	-	-	-	-	-		-
Коефіцієнт кореляції Спірмена (r_s) для живильного середовища СМ*									
	Глк	Фру	ДП2	ДП3	ДП4	ДП5	ДП6	ΣC	ΣS
Вихід									-
біомаси	-0,250	0,100	-0,925	-0,125	-	-	-		0,450
Загальні	0,500	0,900	0,650	0,875	-	-	-		
каротиноїди									0,700
β -каротин		-0,900	0,375		-	-	-		-
									0,200
Астаксантин		-0,775		-0,925	-	-	-		-
									0,625
Лікопен	0,500	0,900	0,225	-0,200	-	-	-		0,700
Торулородин	-	-	-	-	-	-	-		-

Слід підкреслити, що в літературі на сьогоднішній день відсутні повідомлення про штам *R. diobovatum*, який синтезує лікопен як основний каротиноїдний пігмент. Однак профіль пігментів, синтезованих цими дріжджами, не був широко проаналізований. Buzzini та співавтори (2007) і Yurkov та співавтори (2008) встановили, що *R. diobovatum* синтезують торулін, торулородин, β - і γ -каротин, а також слідові кількості інших каротиноїдів. Лікопен являється проміжним метаболічним компонентом при біосинтезі β -каротину та зазначених пігментів, і, таким чином, він може бути знайдений серед каротиноїдів, що синтезують *R. diobovatum*. Крім того, *Rhodotorula glutinis* в присутності метаболічного регулятора біосинтезу β -каротину, такого як імідазол, може синтезувати лікопен без супутнього синтезу β -каротину [178].

Проте, незалежно від цих умов, у всіх досліджуваних нами випадках лікопен був основним каротиноїдним пігментом, синтезованим клітинами *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. Підбираючи живильні середовища й інтенсивність освітленості можна регулювати склад каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. У деяких випадках такий підбір умов культивування може дозволити отримувати до 95% лікопену в біомасі дріжджів, а також такий підбір можна розглядати як спосіб отримання чистого цільового продукту.

Отримані результати дозволяють зробити два висновки:

- а) накопичення каротиноїдів індукується умовами (середовищем) культивування, а не процесом накопичення біомаси при старінні культури;
- б) якісний і кількісний склад каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 залежить від умов культивування (світло, температура і характеристика середовища культивування) і є варіабельним показником.

Можна вважати, що індукція каротиногенезу є адаптивною реакцією клітин *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на умови культивування. Ми вважаємо, що під адаптивністю не слід розуміти тільки функціональну активність каротиноїдів в клітинах дріжджів. Синтез каротиноїдів, який починається з ацетил-КоА, може розглядатися і як необхідність утилізації метаболітів клітини у відносно нейтральний пул каротиноїдів. Або, іншими словами, адаптивні реакції можуть розглядатися в кількох аспектах: «скидання» метаболітів в нейтральний пул каротиноїдів і функціонально активна роль каротиноїдів в якості антиоксидантів [179], компонентів фоточутливої системи і інших функцій. Співвідношення цих двох адаптивно-значущих метаболічних потоків залежатиме від умов культивування.

Висновки до розділу 6:

Підсумовуючи вище сказане у цьому розділі, слід зробити висновок, що дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 здатні рости і накопичувати біомасу на різних природних живильних середовищах, що містять невелику кількість

глюкози й інших моносахаридів, а також засвоювати олігосахариди, що складаються з 2 - 6 мономерів. Засвоєні тетра-, пента- та гексасахариди впливають на зміст β -каротину в клітинах цих дріжджів. *R. diobovatum* IMB Y-5023 не потребують освітлення і можуть культивуватися в темряві. Різний вуглеводний склад середовищ, ймовірно, визначає метаболічну спрямованість *R. diobovatum* IMB Y-5023, наслідком якої є різна ефективність споживання цукрів і, відповідно, різний вихід біомаси та різний вміст каротиноїдів у ній *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Основні результати розділу опубліковані у працях [145, 147, 180].

ВИСНОВКИ

Досліджено особливості росту й каротиногенезу дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, а також розроблено такі способи їх культивування, що дозволяють отримувати високий вихід біомаси та каротиноїдних пігментів даного продуценту з використанням живильних середовищ із низьким вмістом моносахаридів за культивування у темряві.

1. Натуральні живильні середовища забезпечували більш інтенсивний ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 порівняно зі стандартними синтетичними середовищами. Максимальний вихід біомаси (7 - 8,8 г/л сухої маси) дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 отримано на натуральних живильних середовищах, таких як: морквяний екстракт і екстракт пшеничних висівок після попереднього культивування *P. ostreatus*.

2. Для отримання максимальної кількості цільових продуктів тривалість культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 повинна становити не менше 120 годин, незалежно від середовища.

3. Попереднє короткострокове (2 доби) культивування *P. ostreatus* на екстракті пшеничних висівок супроводжується зміною складу середовища. Така зміна складу середовища супроводжувалась пригніченням росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому середовищі. Короткочасне (5 хв) прогрівання до 100° С модифікованого *P. ostreatus* середовища забезпечувало значно кращий ріст дріжджів на такому середовищі зі збільшенням виходу біомаси як мінімум на 40%. Для модифікованого *P. ostreatus* середовища було характерне багаторазове (у 278 разів) збільшення вмісту глюкози та інших низькомолекулярних цукрів.

4. Дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть рости на середовищах, до складу яких входить велика кількість ліпідів (300-350 мг/мл). Кукурудзяна барда після її попередньої підготовки (поділ шляхом флотації або сепарування, а також доведення рН до 5-6,5) може бути використана для промислового виробництва біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, що містить каротиноїди та інші біологічно активні речовини.

5. Найбільший вихід каротиноїдів (24,98 мг/г сухої біомаси) був отриманий на синтетичному середовищі YM. Між виходом біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на різних живильних середовищах у темряві і накопиченням каротиноїдів у їх клітинах не було виявлено прямої залежності. Встановлено, що склад каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* IMB Y-5023 залежить від складу живильного середовища. Серед каротиноїдів *R. diobovatum* IMB Y-5023 виявлені: лікопен, β -каротин, астаксантин, торулоридин.

6. Вперше встановлено, що культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 можна здійснювати в темряві. Освітленість надавала різний ефект на накопичення біомаси дріжджів і вміст каротиноїдів у ній, в залежності від середовища культивування: впливала на кількісний склад каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* IMB Y-5023 і не чинила впливу на їх якісний склад.

7. Дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 здатні рости на середовищах з низьким вмістом глюкози (0,33 г/л). Виявлено відсутність прямої кореляції або наявності зворотної кореляції між кількістю спожитої глюкози і виходом біомаси на досліджуваних живильних середовищах. Найбільша ефективність перетворення спожитих цукрів у біомасу за культивування в темряві спостерігалася на середовищі BYP.

8. Склад цукрів у середовищі культивування визначає метаболічну спрямованість дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Встановлено наявності кореляції між різними фракціями спожитих цукрів і досліджуваними параметрами: на середовищі CM пряма кореляція була виявлена між лікопеном і кількістю спожитої фруктози ($r_s=0,9$); на середовищах YM і BYP така кореляція спостерігалася між β -каротином і кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів і пентасахаридів, а також між лікопеном і кількістю спожитих пентасахаридів. На середовищі YM виявлена пряма кореляція між вмістом торулоридину і кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів, пентасахаридів і гексасахаридів ($r_s=0,8$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lucas A., Baker B. A., Desai M., Hales C. N. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring // *British Journal of Nutrition*. 1996. Vol. 76(4). P. 605–612.
2. Huang C. J., Fwu M. L. Degree of Protein Deficiency Affects the Extent of the Depression of the Antioxidative Enzyme Activities and the Enhancement of Tissue Lipid Peroxidation in Rats // *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*. 1993. Vol. 123(5). P. 803–810.
3. Smil V. Nitrogen and Food Production: Proteins for Human Diets // *Royal Swedish Academy of Sciences*. 2002. Vol. 31(2). P.126–131.
4. Fairfield K. M., Fletcher R.H. Vitamins for Chronic Disease Prevention in Adults: scientific review // *Scientific Review. JAMA*. 2002. Vol. 287(23). P. 3116–3126.
5. Akeda Y., Galán J. E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion // *Nature*. 2005. Vol. 437. P. 911–915.
6. Stahl W., Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids // *Biochim Biophys Acta*. 2005. Vol. 1740(2). P. 101–107.
7. Walter M.H., Strack D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions // *Nat Prod Rep*. 2011. Vol. 28(4). P. 663–692.
8. Сімонова М. Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія // *Біологічні Студії*. 2010. Т. 4, №2. С. 159–170.
9. Blumberg J, Block G. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study in Finland // *Nutrition reviews*. 1994. Vol. 52(7). P. 242–245.
10. Krinsky N. I., Johnson E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease // *Molecular aspects of medicine*. 2005. Vol. 26(6). P. 459–516.
11. Voutilainen S., Nurmi T., Mursu J., Rissanen T. H. Carotenoids and cardiovascular health // *The American journal of clinical nutrition*. 2006. Vol. 83(6). P. 1265–1271.

12. Ziegler R. G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer // *The Journal of Nutrition*. 1989. Vol. 119(1). P. 116–122.
13. Palozza P., Simone R. E., Catalano A., Mele M. C. Tomato lycopene and lung cancer prevention: from experimental to human studies // *Cancers*. 2011. Vol. 3(2). P. 2333–2357.
14. März U. The global market for carotenoids // BCC Research. Report ID: FOD025E. P. 2015. P. 1–5.
15. Marova I., Certik M., Breierova E. Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts – application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds // *INTECH Open Access Publisher*. 2011. P. 345–384.
16. Masetto A., Flores–Cotera L. B., Díaz C., Langley E., Sanche S. Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp // *Journal of bioscience and bioengineering*. 2001. Vol. 92(1). P. 55–58.
17. Netzer R., Stafsnes M. H., Andreassen T., Goksøyr A., Bruheim P., Brautaset, T. Biosynthetic pathway for γ -cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: Heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases // *Journal of bacteriology*. 2010. Vol. 192(21). P. 5688–5699.
18. Ye Z. W., Jiang J. G., Wu G. H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects // *Biotechnology advances*. 2008. Vol. 26(4). P. 352–360.
19. Lorenz R. T., Cysewski G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin // *Trends in biotechnology*. 2000. Vol. 18(4). P. 160–167.
20. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition // *TRENDS in Biotechnology*. 2003. Vol. 21(5). P. 210–216.

21. Pérez–López P., González–García S., Jeffryes C., Agathos S. N., McHugh E., Walsh D., Moreira M. T. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale // *Journal of cleaner production*. 2014. Vol. 64. P. 332–344.
22. Schmidt A. D., Heinekamp T., Matuschek M., Liebmann B., Bollschweiler C., Brakhage A. A. Analysis of mating–dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes *carB* and *carRA* by quantitative real–time PCR // *Applied microbiology and biotechnology*. 2005. Vol. 67(4). P. 549–555.
23. Stachowiak B. Effect of illumination intensities on astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants // *Food Science and Biotechnology*, 2013. Vol. 22(4). P. 1033–1038.
24. Davoli P., Mierau V., Weber R. W. S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004. Vol. 40(4). P. 392–397.
25. Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., van Broock M., Mulinacci N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus* // *Canadian Journal of Microbiology*. 2007. Vol. 53(8). P. 1024–1031.
26. Munch G, Sestric R, Sparling R, Levin D.B., Cicek N. Lipid production in the under–characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel–derived waste glycerol // *Biores Technol*. 2015. Vol. 185. P. 49–55.
27. Utkhede R., Koch C. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes // *Biocontrol*. 2004. Vol. 49(3). P. 305–313.
28. Божков А. И. Комаристая В. П. Липидно–каротиноидный обмен в клетках *Dunaliella* Teod. При различных условиях культивирования // *Альгология*. 2003. 13, №2, С. 137–147.
29. Бабьева И. П., Чернов И. Ю. Биология дрожжей. Москва: Товарищество науч. изд. КМК, 2004. 221 с.

30. Newell S. Y., Hunter I. L. *Rhodosporidium diobovatum* sp. n., the perfect form of an asporogenous yeast (*Rhodotorula* sp.) // *Journal of bacteriology*. 1970. Vol. 104(1). P. 503–508.
31. Libkind D., Moliné M., Sampaio J. P., Van Broock M. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation // *FEMS microbiology ecology*. 2009. Vol. 69(3). P. P. 353–362.
32. Libkind D., Brizzio S., Ruffini A., Gadanho M., van Broock M., Sampaio J. P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2003. Vol. 84(4). P. 313–322.
33. Seshadri S., Saranya K., Kowshik M. Green synthesis of lead sulfide nanoparticles by the lead resistant marine yeast, *Rhodosporidium diobovatum* // *Biotechnology progress*. 2011. Vol. 27(5). P. 1464–1469.
34. Burgaud G., Arzur D., Durand L., Cambon–Bonavita M. A., Barbier G. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna // *FEMS microbiology ecology*. 2010. Vol. 73(1). P. 121–133.
35. Kvasnikov E. I., Nagornaia S. S., Shchelokova I. F. Yeast flora of plant rhizosphere and phyllosphere // *Mikrobiologiya* 1975. Vol. 44(2). P. 339–346.
36. Yurkov A. M., Vustin M. M., Tyaglov B. V., Maksimova I. A., Sinekiy S. P. Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q 10 // *Microbiology*. 2008. Vol. 77(1). P. 1–6.
37. Kocková–Kratochvílová A., Bystrický S. The problem of carotenoid biosynthesis in the taxonomy of genera *Rhodotorula* and *Rhodosporidium* // *Mycopathologia*. 1974. Vol. 54(4). P. 409–419.
38. Frengova G. I., Beshkova D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2009. Vol. 36(2). P. 163.

39. Latha B. V., Jeevaratnam K. Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source // *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 2010. Vol. 5(3). P. 166–174.
40. Chandi G. K., Singh S. P., Gill B. S., Sogi D. S., Singh P. Optimization of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* // *Food Science and Biotechnology*. 2010. Vol. 19(4). P. 881–887.
41. El-Banna A. A. E. R., El-Razek A. M. A., El-Mahdy A. R. Isolation, identification and screening of carotenoid-producing strains of *Rhodotorula glutinis* // *Food and Nutrition Sciences*. 2012. Vol. 3(05). P. 627.
42. Sitepu I. R., Garay L. A., Sestric R., Levin D., Block D. E., German J. B., Boundy-Mills K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production // *Biotechnology advances*. 2014. Vol. 32(7). P. 1336–1360.
43. Utkhede R., Bogdanoff C., McNevin J. Effects of biological and chemical treatments on Botrytis stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2001. Vol. 23(3). P. 253–259.
44. Utkhede R. S., Mathur S. Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea* // *Canadian journal of microbiology*. 2002. Vol. 48(6). P. 550–554.
45. Cao Y., Utkhede R. S. Rapid molecular technique for identification of a biological control agent *Rhodosporidium diobovatum* // *Biocontrol science and technology*. 2005. Vol. 15(8). P. 827–834.
46. Utkhede R., Bogdanoff C. Influence of lysozyme, yeast, azoxystrobin, and myclobutanil on fungal diseases of cucumbers grown hydroponically // *Crop Protection*. 2003. Vol. 22(2). P. 315–320.
47. Osman H. M., Darwish S. M., El-Difrawy E. A., Debever J. M. The inhibitory effect of lysozyme on the growth of some pathogenic and spoilage bacteria // *Alexandria Journal of Agricultural Research*. Egypt. 1995.

48. Brown A. J., Gow N. A. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis // Trends in microbiology. 1999. Vol. 7(8). P. 333–338.
49. Marova I., Carnecka M., Halienova A., Certik, M., Dvorakova T., Haronikova A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production // Journal of Environmental Management. 2012. Vol. 95. P.338–342.
50. Xiao W. Yeast Protocols (Methods in Molecular Biology). Second edition. 2005, Totowa, New Jersey: Humana Press. 392 p.
51. Biology and activities of yeasts / edited by F.A. Skinner, Susan M. Passmore and R.R. Davenport. London : New York : Academic Press. 1980.
52. Talaro K. P., Talaro A. Foundations in Microbiology. Pasadena: McGraw-Hill. 2001. 889 p.
53. Čárnecká M. Molecular study of intracellular changes as response of microorganisms to environment. Brno, 2009. 120 p. PHD thesis at Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection. Supervised by Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
54. Mann J.: Secondary Metabolism. Second edition. USA: Oxford University Press. 1990. 390 p.
55. Walker G. M. Yeast physiology and biotechnology. West Sussex, England: John Willey & Sons Ltd. 1998. 362 p.
56. Gasch A. P., Werner-Washburne M. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation // Functional & integrative genomics. 2002. Vol. 2(4–5). P. 181–192.
57. Rosa C., Peter G. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (The Yeast Handbook). December 7, Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 2005. 580 p.
58. Somashekar D., Joseph R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth

- medium // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2000. Vol. 16(5). P. 491–493.
59. Libkind D., Gadanho M., Broock M. V., Sampaio, J. P. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina // Journal of basic microbiology. 2008. Vol. 48(2). P. 93–98.
 60. Aksu Z., Eren A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source // Process Biochemistry. 2005. Vol. 40(9). P. 2985–2991.
 61. Parajó J. C., Santos V., Vázquez M. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. Biotechnology and bioengineering // 1998. Vol. 59(4). P. 501–506.
 62. Bhosale P., Gadre R. V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach // Letters in applied Microbiology. 2001. Vol. 33(1). P. 12–16.
 63. Squina F. M., Yamashita F., Pereira J. L., Mercadante A. Z. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice // Food Biotechnology. 2002. Vol. 16(3). P. 227–235.
 64. Martin A. M., Lu C., Patel T. R. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts // Journal of fermentation and bioengineering. 1993. Vol. 76(4). P. 321–325.
 65. Park P. K., Cho D. H., Kim E. Y., Chu K. H. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21(4). P. 429–434.
 66. Tinoi J., Rakariyatham N., Deming R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate // Process Biochemistry. 2005. Vol. 40(7). P. 2551–2557.

67. Buzzini, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000. Vol. 24(1). P. 41–45.
68. Libkind D., van Broock M. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006. Vol. 22(7). P. 687–692.
69. Buzzini P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*–*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup // *Journal of applied Microbiology*. 2001. Vol. 90(5). P. 843–847.
70. Frengova G., Simova E., Pavlova K., Beshkova D., Grigorova D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate // *Biotechnology and bioengineering*. 1994. Vol. 44(8). P. 888–894.
71. Frengova G., Simova E., Beshkova D. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra* // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2004. Vol. 112(3). P. 133–141.
72. Simova E. D., Frengova G. I., Beshkova D. M. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra*–*Lactobacillus casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultrafiltrate // *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2003. Vol. 58(3–4). P. 225–229.
73. Simova E. D., Frengova G. I., Beshkova D. M. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004. Vol. 31(3). P. 115–121.
74. Certik M., Hanusova V., Breierova E., Marova I., Raptá P. Biotechnological production and properties of carotenoid pigments. 2009. 415 p.
75. Hohmann S., Mager, W.H. *Yeast Stress Responses*. Berlin: Springer-Verlag. 2003. 389 p.

76. Latha B. V., Jeevaratnam K., Murali H. S., Manja K. S. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR–PDY from natural source. 2005.
77. Marova I., Breierov, E., Koci R., Friedl Z., Slovak B., Pokorna J. Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts // *Annals of microbiology*. 2004. Vol. 54(1). P. 73–86.
78. Marova I., Carnecka M., Halienova A., Breierova E., Koci R. Production of carotenoid–ergosterol–supplemented biomass by red yeast *Rhodotorula glutinis* grown under external stress // *Food Technology and Biotechnology*. 2010. Vol. 48(1). P. 56.
79. Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel–Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O.. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes // *Molecular biology of the cell*. 2000. Vol. 11(12). P. 4241–4257.
80. Britton G. Functions of intact carotenoids. In *carotenoids*. 2008. P. 189–212. Birkhäuser Basel.
81. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. *Carotenoids*, Vol. 4: natural functions. 2008.
82. Pelz A., Wielan, K. P., Putzbach K., Hentschel P., Albert K., Götz F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus* // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280(37). P. 32493–32498.
83. Krubasik P., Kobayashi M., Sandmann G. Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50 carotenoid formation // *The FEBS Journal*. 2001. Vol. 268(13). P. 3702–3708.
84. Krubasik P., Takaichi S., Maoka T., Kobayashi M., Masamoto K., Sandmann G. Detailed biosynthetic pathway to decaprenoxanthin diglucoside in *Corynebacterium glutamicum* and identification of novel intermediates // *Archives of microbiology*. 2001. Vol. 176(3). P. 217–223.

85. Arrach N., Fernández–Martín R., Cerdá–Olmedo E., Avalos J. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Vol. 98(4). P. 1687–1692.
86. Schmidt–Dannert C., Umeno D., Arnold F. H. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways // *Nature biotechnology*. 2000. Vol. 18(7). P. 750.
87. Schmidt–Dannert C. Engineering novel carotenoids in microorganisms // *Current opinion in biotechnology*. 2000. Vol. 11(3). P. 255–261.
88. Graham, J. E., Bryant, D. A. The biosynthetic pathway for synechoxanthin, an aromatic carotenoid synthesized by the euryhaline, unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 // *Journal of bacteriology*. 2008. Vol. 190(24), P. 7966-7974.
89. Maresca J. A., Graham J. E., Bryant D. A. The biochemical basis for structural diversity in the carotenoids of chlorophototrophic bacteria // *Photosynthesis research*. 2008. Vol. 97(2). P. 121–140.
90. Ritz T., Damjanović A., Schulten K., Zhang J. P., Koyama Y. Efficient light harvesting through carotenoids // *Photosynthesis Research*. 2000. Vol. 66(1–2). P. 125–144.
91. Moran N. A., Jarvik T. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids // *Science*. 2010. Vol. 328(5978). P. 624–627.
92. Sakaki H., Nochide H., Nakanishi T., Miki W., Fujita T., Komemushi S. Effect of culture condition on the biosynthesis of carotenoids in *Rhodotorula glutinis* No. 21 // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999. Vol. 3(87). P. 400.
93. Bae M., Lee T. H., Yokoyama H., Boettger H. G., Chichester C. O. The occurrence of plectanixanthin in *Cryptococcus laurentii* // *Phytochemistry*. 1971. Vol. 10(3). P. 625–629.

94. Madhour A., Anke H., Mucci A., Davoli P., Weber R. W. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi) // *Phytochemistry*. 2005. Vol. 66(22). P. 2617–2626.
95. Maldonade I. R., Rodriguez–Amaya D. B., Scamparini A. R. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem // *Food Chemistry*. 2008. Vol. 107(1). P. 145–150.
96. Dufossé L. Microbial production of food grade pigments // *Food Technology and Biotechnology*. 2006. Vol. 44(3). P. 313–323.
97. Moliné M., Libkind D., del Carmen Diéguez M., van Broock M. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: response to UV–B of pigmented and naturally–occurring albino strains // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009. Vol. 95(3). P. 156–161.
98. Meyer P. S., Du Preez, J. C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1994. Vol. 10(2). P. 178–183.
99. Johnson E. A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey // *International Microbiology*. 2003. Vol. 6(3). P. 169–174.
100. Simpson K. L., Nakayama T. O. M., Chichester C. O. Biosynthesis of yeast carotenoids // *Journal of bacteriology*. 1964. Vol. 88(6). P. 1688–1694.
101. Schroeder W. A., Johnson E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage // *Journal of industrial microbiology*. 1995. Vol. 14(6). P. 502–507.
102. Sundin G. W., Jacobs J. L. Ё Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field–grown peanut (*Arachis hypogaeae* L.) // *Microbial Ecology*. 1999. Vol. 38(1). P. 27–38.
103. Maxwell W. A., Macmillan J. D., Chichester C. O. Function of carotenoids in protection of *Rhodotorula glutinis* against irradiation from a gas laser // *Photochemistry and Photobiology*. 1966. Vol. 5(7). P. 567–577.

104. Macmillan J. D., Maxwell W. A., Chichester C. O. Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser // Photochemistry and photobiology. 1966. Vol. 5(7). P. 555–565.
105. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function // The FASEB Journal. 1995. Vol. 9(15). P. 1551–1558.
106. Tisch D., Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi // Applied microbiology and biotechnology. 2010. Vol. 85(5). P. 1259–1277.
107. Prado-Cabrero A., Schaub P., Díaz-Sánchez V., Estrada A. F., Al-Babili S., Avalos J. Deviation of the neurosporaxanthin pathway towards β -carotene biosynthesis in *Fusarium fujikuroi* by a point mutation in the phytoene desaturase gene // The FEBS journal. 2009. Vol. 276(16). P. 4582–4597.
108. Estrada A. F., Maier D., Scherzinger D., Avalos J., Al-Babili S. Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation // Fungal Genetics and Biology. 2008. Vol. 45(11). P. 1497–1505.
109. Martín J. F., Gudiña E., Barredo J. L. Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase–ketolase protein // Microbial Cell Factories. 2008. Vol. 7(1). P. 3.
110. Lange B. M., Rujan T., Martin W., Croteau R. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. Vol. 97(24). P. 13172–13177.
111. Goodwin T. W. Biosynthesis of carotenoids. In The biochemistry of the carotenoids. 1980. P. 33–76. Springer, Dordrecht.
112. Goodwin T. W. Biosynthesis of carotenoids: An overview // In Methods in enzymology. 1993. Vol. 214. P. 330–340.
113. Andrewes, A. G., Phaff H. J., Starr, M. P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast // Phytochemistry. 1976. Vol. 15(6). P. 1003–1007.

114. Johnson E. A., Lewis M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* // *Microbiology*. 1979. Vol. 115(1). P. 173–183.
115. An G. H., Schuman D. B., Johnson E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content // *Applied and Environmental Microbiology*. 1989. Vol. 55(1). P. 116–124.
116. Carail M., Caris-Veyrat C. Carotenoid oxidation products: From villain to saviour // *Pure and applied chemistry*. 2006. Vol. 78(8). P. 1493–1503.
117. Schimek C., Wöstemeyer J. Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi // *Phytochemistry*. 2009. Vol. 70(15–16). P. 1867–1875.
118. Almeida, E. R., Cerdá-Olmedo, E. Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* // *Current genetics*. 2008. Vol. 53(3). P. 129–137.
119. Штамм дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* - продуцент каротиноидов: патент РФ № 2406757. 2009126299/10; заявл.10.07.2009; опубл. 20.12.2010, Бюл. № 35
120. Stachowiak B. Astaxanthin synthesis by yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its mutants on media based on plant extracts // *Indian J Microbiol*. 2012. Vol. 52. P. 654–659.
121. Камзолкина О. В., Панчева Е. В., Волкова В. Н., Козлова М. В. Микроморфологические особенности штаммов *Pleurotus pulmonarius* (FR.) Quel. и *P. osteriatus* (JACQ.) P. Kumm., культивируемых отдельно и совместно с дрожжами // *Цитология*. 2006. Vol. 48(2). P. 153–160.
122. Савельева А.В., Стручкова И.В., Смирнов В.Ф. Способность некоторых базидиомицетов синтезировать фенолокисляющие ферменты // *Микология и фитопатология*. 2008. Т. 42. С. 270–277.
123. Ахмедова З.Р. Целлюлолитические, ксиланолитические и лигнолитические ферменты гриба *Pleurotus ostreatus* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1994. Т. 30. С. 42–48.

124. Белова Н.В. Перспективы использования активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология. 2004. вып. 2. С. 1–7.
125. Белова Н.В. Продукция лакказ у базидиомицетов при ферментации в различных условиях // Успехи медицинской микологии. 2006. Т. IX. С. 144–145.
126. Nakano H., Namatame K., Nemoto H., Motohashi H., Nishiyama K., Kumada K. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. Kanagawa Lentinan Research Group // Hepato-gastroenterology. 1999. Vol. 46(28), P. 2662-2668.
127. Oba K., Kobayashi M., Matsui T., Kodera Y., Sakamoto J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer // Anticancer research. 2009. Vol. 29(7), P. 2739-2745.
128. Bisen P. S., Baghel R. K., Sanodiya B. S., Thakur G. S., Prasad G. B. K. S. Lentinus edodes: a macrofungus with pharmacological activities // Current Medicinal Chemistry. 2010. Vol. 17(22), P. 2419-2430.
129. Sedmak J. J., Weerasinghe D. K., Jolly S. O. Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* // Biotechnology Techniques. 1990. Vol. 4(2). P. 107–112.
130. Gramza–Michałowska A., Stachowiak B. The antioxidant potential of carotenoid extract from *Phaffia rhodozyma* // Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 2010. Vol. 9(2). P. 171–188.
131. Gumienna M, Szwengiel A, Lasik M et al. Effect of corn grain variety on the bioethanol production efficiency // Fuel 2016. Vol. 164. P. 386–392.
132. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г. Преперативная Биохимия липидов. Москва: Наука, 1981. С.35– 45.

133. Sakia R.M. The Box-Cox Transformation Technique: A Review // Journal of the Royal Statistical Society. Series D (The Statistician). 1992. Vol. 41. P. 169–178.
134. Köhn H-F, Hubert LJ. Hierarchical Cluster Analysis. Wiley Stats // Statistics Reference Online. 2015. P. 1–13.
135. Ward J. H. Jr. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function // Journal of the American Statistical Association. 1963 Vol. 58. No. 301. P. 236–244.
136. Hauke J., Kossowski T. Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficients on the same sets of data // Quaestiones Geographicae. 2011. Vol. 30. P. 87–93.
137. Burman P. A comparative study of ordinary cross-validation, v-fold cross-validation and the repeated learning-testing methods // Biometrika 1989. Vol. 76. P. 503–514.
138. Chyi Y.L., Lai Y.M., Liu W.H. Knowledge spillovers and firm performance in the high-technology industrial cluster // Research Policy. 2012. Vol. 41(5). P. 556–564.
139. Wise B.M., Gallagher N.B. The process chemometrics approach to process monitoring and fault detection // Journal of Process Control. 1996. Vol. 6(6). P. 329–348.
140. Johnson V.E. Revised standards for statistical evidence // Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2013. Vol. 110(48). P. 19313–19317.
141. StatSoft, Inc. Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK: StatSoft. 2013. URL: <http://www.statsoft.com/textbook/>.
142. Hill T., Lewicki P. Statistics: Methods and Applications. Tulsa, OK: StatSoft. 2007. 719 p.
143. Buzzini P., Martini A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin // Bioresource Technology. 1999. Vol. 71. P. 41–44.

144. Šramková Z., Gregova E., Turdik E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain // *Acta Chimica Slovaca*. 2009. Vol. 2(1). P. 115–138.
145. Єльчіщева Ю., Голтвянський А. Ріст і вміст каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 на натуральних і синтетичних живильних середовищах // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2015. № 70. С. 221–229.
146. Ielchishcheva Iu., Bozhkov A., Goltvianskiy A., Kurguzova N. The Effect of Lipid Components of Corn Vinasse on the Growth Intensity of Yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016. Vol. 5(10). P. 467-477.
147. Ielchishcheva Iu., Stachowiak B., Szwengiel A., Bozhkov A. Growth and carotenogenesis in *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023: effects of culture medium and illumination intensity // *FEMS Microbiology Letters*. 2018. Vol. 365(1). P. 1-8.
148. Белицкий И. В., Соболева Н. Ю. Получение биомассы лекарственных грибов в погруженной культуре // *Успехи медицинской микологии*. 2001. Т. 1. С. 77–79.
149. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов с использованием субстратов, иммобилизованных в геле агарозы // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45, № 4. С. 497-501.
150. Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid–state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition // *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99. P. 457–462.
151. Willis R. J. The History of allelopathy. Springer: 3. 2007. 316 p.
152. Lazzeri L., Manici L.M. Allelopathic effect of Clucosinolate-containing plant green manure on Pythium sp. and total fungal population in soil // *Hortscience*. 2001. Vol. 36(7). P. 1283–1289.

153. Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J. M. Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions // Science. 2003. Vol. 301. P. 1377–1380.
154. Goltvianskiy A., Ielchishcheva Iu., Stachowiak B., Szwengiel A., Bozhkov A. Preculture of *Pleurotus ostreatus* Increases the Yield of Yeast Biomass // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2015. Vol. 4(3), P. 124-133.
155. Ельчищева Ю. В., Голтвянский А. В. Влияние экзометаболитов базидиомицета *Pleurotus ostreatus*, полученных в жидкой культуре, на интенсивность роста дрожжей *Rhodosporidium diobovatum* // Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии. Сборник статей по материалам XIV международной заочной научно-практической конференции. 2014. №2 (14). С. 107-114.
156. Голтвянський А., Єльчіщева Ю. Оцінка ефекту стимуляції інтенсивності росту дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* продуктами життєдіяльності базидіомицетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* // Молодь і поступ біології: збірник тез IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського, 16-19 квітня 2013 р. Львів, 2013. С. 154-155.
157. Ельчищева Ю. В., Голтвянский А. В. Характеристика роста и биомассы мицелия *Pleurotus ostreatus* (JACQ.) P. KUMMER в жидких культурах // Матеріали VI Міжнародної наукової конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченої 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В. І. Липського, 13-17 травня 2013 р. Одеса, 2013. С. 271-272.
158. Ельчищева Ю. В., Голтвянский А. В. Оптимизация питательной среды для культивирования дрожжей *Rhodosporidium diobovatum* // Ukrainian biochemical journal: матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р. Київ, 2014. Vol. 86, № 5 (2). P. 192-193.

159. Belyea R.L., Rausch K.D., Tumbleson M.E.. Composition of corn and distillers dried grains with soluble from dry grind ethanol processing // Bioresource Technology. 2004. Vol. 94. P. 293–298.
160. Xu J., Zhao X., Wang W., Du W., Liu D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production // Biochemical Engineering Journal. 2012. Vol. 65. P. 30–36.
161. Chi Z., Zheng Y., Jiang A., Chen S. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process // Appl. Biochem. Biotech. 2011. Vol. 165. P. 442–453.
162. Bibb M. J., Ward J. M., Hopwood D. A. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency // Nature. 1978. Vol. 274(5669). P. 398.
163. Licht T.R., Laugesen D., Jensen L.B., Jacobsen B.L. Transfer of the Pheromone-Inducible Plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* Microorganisms Colonizing the Intestine of Mini-Pigs // Applied and Environmental Microbiology. 2002. Vol. 68(1). P. 187–193.
164. Nagy Z., Chandler M. Regulation of transposition in bacteria // Research in Microbiology. 2004. Vol. 155. P. 387–398.
165. Barre F.X., Sherratt D.J. Xer site-specific recombination: Promoting chromosome segregation, in: Craig N.L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A.M. (Eds.). Mobile DNA II, ASM Press, Washington, DC, 2002. P. 149–161.
166. Nicholson B., Low D. DNA methylation-dependent regulation of Pefexpression in *Salmonella typhimurium* // Molecular Microbiology. 2000. Vol. 35(4). P. 728–742.
167. Ielchishcheva Iu., Bozhkov A., Goltvianskiy A., Kurguzova N. The Effect of Lipid Components of Corn Vinasse on the Growth Intensity of Yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2016. Vol. 5(10). P. 467–477.
168. Ельчищева Ю. В., Кургузова Н. И. Влияние липидных компонентов кукурузной барды на особенности роста и накопление биомассы

- дрожжей штамма *Rhodospiridium diobovatum* // «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки»: матеріали X Міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців, 19-23 березня 2012 р. Київ, 2012. С. 107-108.
169. Guo W., Tang H., Zhang L. Lycopene cyclase and phytoene synthase activities in the marine yeast *Rhodospiridium diobovatum* are encoded by a single gene crtYB // *Journal of Basic Microbiology*. 2014. Vol. 54(10). P. 1053–1061.
 170. Dae Haeng Cho, Hee Jeong Chae, Eui Yong Kim. Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis* // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001. Vol. 95(3). P. 185–193
 171. Sommaruga R. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001. Vol. 62. P. 35–42.
 172. Zhang Z., Zhang X., Tan T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation // *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 157. P. 149–153.
 173. de la Fuente J.L., Rodríguez-Sáiz M., Schleissner C., Díez B., Peiro E., Barredo J. L. Hightiter production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous* // *Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 148. P. 144–146.
 174. Friedl M. A., Kubicek Ch. P., Druzhinina I. S. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. Vol. 74. P. 245–250.
 175. Sreenath H.K., Jeffries T.W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts // *Bioresource Technology* 2000. Vol. 72(3). P. 253–260.
 176. Silveira W.B., Passos F.J.V., Mantovani H.C., Passos F.M.L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose

- concentration and oxygen levels // Enzyme and Microbial Technology. 2005. Vol. 36(7). P. 930–936.
177. Schuster A., Kubicek Ch. P., Friedl M. A., Druzhinina I. S., Schmoll M. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process // BMC Genomics. 2007. Vol. 8. P. 449.
 178. Hernández-Almanza A., Montanez J. C., Aguilar-González M. A., Martínez-Ávila C., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C.N. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry // Food Bioscience. 2014. Vol. 5. P. 64–72.
 179. Gurpreet K. Ch., Sumeet P. S., Balmeet S. G., Dalbir S. S., Prabhjot S. Optimization of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* // Food Science and Biotechnology. 2010 Vol. 18(4). P. 881–887.
 180. Ielchishcheva Iu., Stachowiak B., Szwengiel A., Bozhkov A. Carbohydrate components of culture media as determinants of the *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 yeast metabolism // Nauka Przyroda Technologie. 2017. Vol. 11, № 3. P. 291–303.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. **Ю. Єльчіщева, А. Голтвянський.** Ріст і вміст каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 на натуральних і синтетичних живильних середовищах // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015. № 70. С. 221–229. (Google Scholar). *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів Rh. diobovatum IMB Y-5023, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».*

Статті в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз

2. Anatoliy Goltvianskiy, **Iuliia Ielchishcheva**, Barbara Stachowiak, Artur Szwengiel, Anatoliy Bozhkov. Preculture of *Pleurotus ostreatus* Increases the Yield of Yeast Biomass // **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 2015. Vol. 4, № 3, P. 124-133. (Index Copernicus, CiteFactor, OAJI, CAS, Universitätsbibliothek Leipzig тощо). *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси дріжджів, підготовлено зразки живильних середовищ до аналізу їх*

складу, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».

3. **Iuliia Ielchishcheva**, Anatoliy Bozhkov, Anatoliy Goltvianskiy, Natalia Kurguzova. The Effect of Lipid Components of Corn Vinasse on the Growth Intensity of Yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 // **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 2016. Vol. 5, №10. P. 467-477. (Index Copernicus, CiteFactor, OAJI, CAS, Universitätsbibliothek Leipzig тощо). *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси дріжджів Rhodospiridium diobovatum IMB Y-5023, а також розроблено способи оптимізації кукурудзяної барди, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».*
4. **Iuliia Ielchishcheva**, Barbara Stachowiak, Artur Szwengiel, Anatoliy Bozhkov. Carbohydrate components of culture media as determinants of the *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023 yeast metabolism // *Nauka Przyroda Technologie*. 2017. Vol. 11, № 3. P. 291–303. (Index Copernicus, Agro, Arianta, CABI, DOAJ, EBSCO). *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів Rhodospiridium diobovatum IMB Y-5023, підготовлено зразки живильних середовищ до аналізу їх вуглеводного складу, розраховано коефіцієнт ефективності перетворення субстрату на біомасу та каротиноїди, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».*
5. **Iuliia Ielchishcheva**, Barbara Stachowiak, Artur Szwengiel, Anatoliy Bozhkov. Growth and carotenogenesis in *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023: effects of culture medium and illumination intensity // *FEMS*

Microbiology Letters. 2018. Vol. 365, № 1. P. 1-8. ([Web of Science](#), Scopus тощо; Impact Factor: 1,765). «Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ та освітленості різної інтенсивності на вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, підготовлено зразки біомаси дріжджів до аналізу їх пігментного складу, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

6. **Ельчищева Ю. В.,** Кургузова Н. И. Влияние липидных компонентов кукурузной барды на особенности роста и накопление биомассы дрожжей штамма *Rhodospiridium diobovatum* // «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки»: матеріали X Міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців, 19-23 березня 2012 р. Київ, 2012. С. 107-108. «Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».
7. Голтвянський А., **Ельчищева Ю.** Оцінка ефекту стимуляції інтенсивності росту дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* продуктами життєдіяльності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* // Молодь і поступ біології: збірник тез IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського, 16-19 квітня 2013 р. Львів, 2013. С. 154-155. «Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».
8. **Ельчищева Ю. В.,** Голтвянский А. В. Характеристика роста и биомассы мицелия *Pleurotus ostreatus* (JACQ.) P. KUMMER в жидких

культурах // Матеріали VI Міжнародної наукової конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченої 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В. І. Липського, 13-17 травня 2013 р. Одеса, 2013. С. 271-272. *«Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».*

9. **Ельчищева Ю. В.,** Голтвянский А. В. Оптимизация питательной среды для культивирования дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* // Ukrainian biochemical journal: матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р. Київ, 2014. Vol. 86, № 5 (2). Р. 192-193. *«Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку».*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

10. **Ельчищева Юлия Владимировна,** Голтвянский Анатолий Владимирович. Влияние экзометаболитов базидиомицета *Pleurotus ostreatus*, полученных в жидкой культуре, на интенсивность роста дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* // Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии. Сборник статей по материалам XIV международной заочной научно-практической конференции. 2014. №2 (14). С. 107-114. *«Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту дріжджів Rh. diobovatum IMB Y-5023, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку».*

ДОДАТОК 2

**Акт впровадження результатів дисертаційної роботи у навчальний
процес біологічного факультету Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з навчальної та інноваційної
роботи Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна



М. О. Азаренков

АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи Єльчіщевої Юлії Володимирівни «Розробка способів культивування каротиноносних дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі: завідувача кафедри молекулярної біології та біотехнології, професора, доктора біологічних наук Божкова А. І., заступника декана з наукової роботи біологічного факультету, заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Наглова О. В. та голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації Єльчіщевої Ю.В., а саме: методичні та аналітичні підходи до вивчення впливу умов культивування на метаболізм каротиноносних дріжджів впроваджені в навчальний процес біологічного факультету у рамках спеціального курсу: «Об'єкти біотехнології» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загального курсу біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Біотехнологія».

Завідувач кафедри
молекулярної біології та
біотехнології,
д.б.н., професор

А. І. Божков

Заступник декана з навчальної
роботи, к.б.н., доцент

О. В. Наглов

Голова методичної комісії
біологічного факультету,
к.б.н., доцент

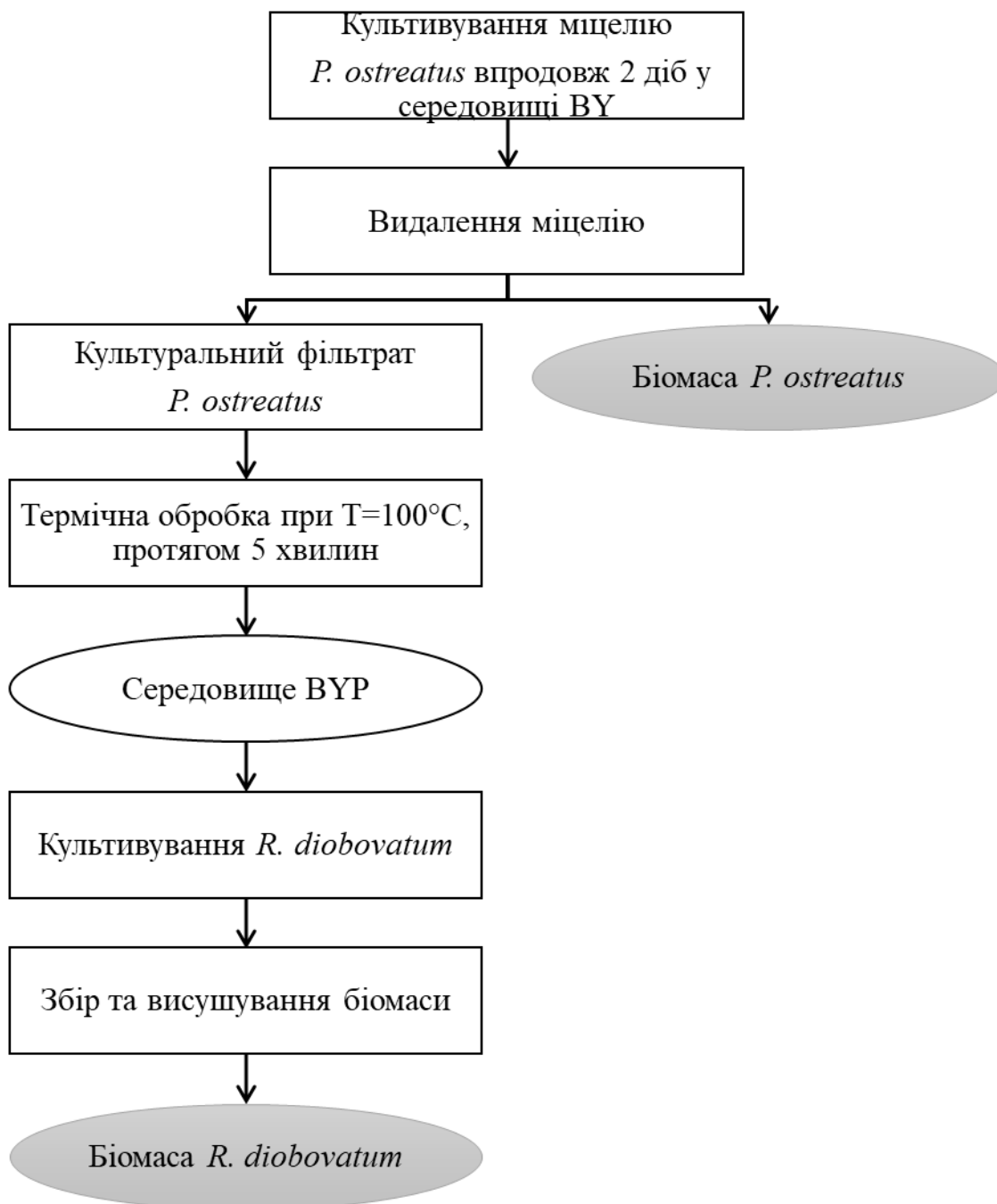
В. В. Мартиненко

ДОДАТОК 3

Схема послідовного культивування *Pleorotus ostreatus* → *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023

Схема послідовного культивування *Pleorotus ostreatus* → *Rhodosporidium diobovatum* ІМВ У-5023, що дозволяє збільшити вихід біомаси дріжджів як мінімум на 40% та отримати два цільових продукта

(умови культивування дріжджів: 5 діб при температурі 22°C, на орбітальній качалці при 150 об/хв)

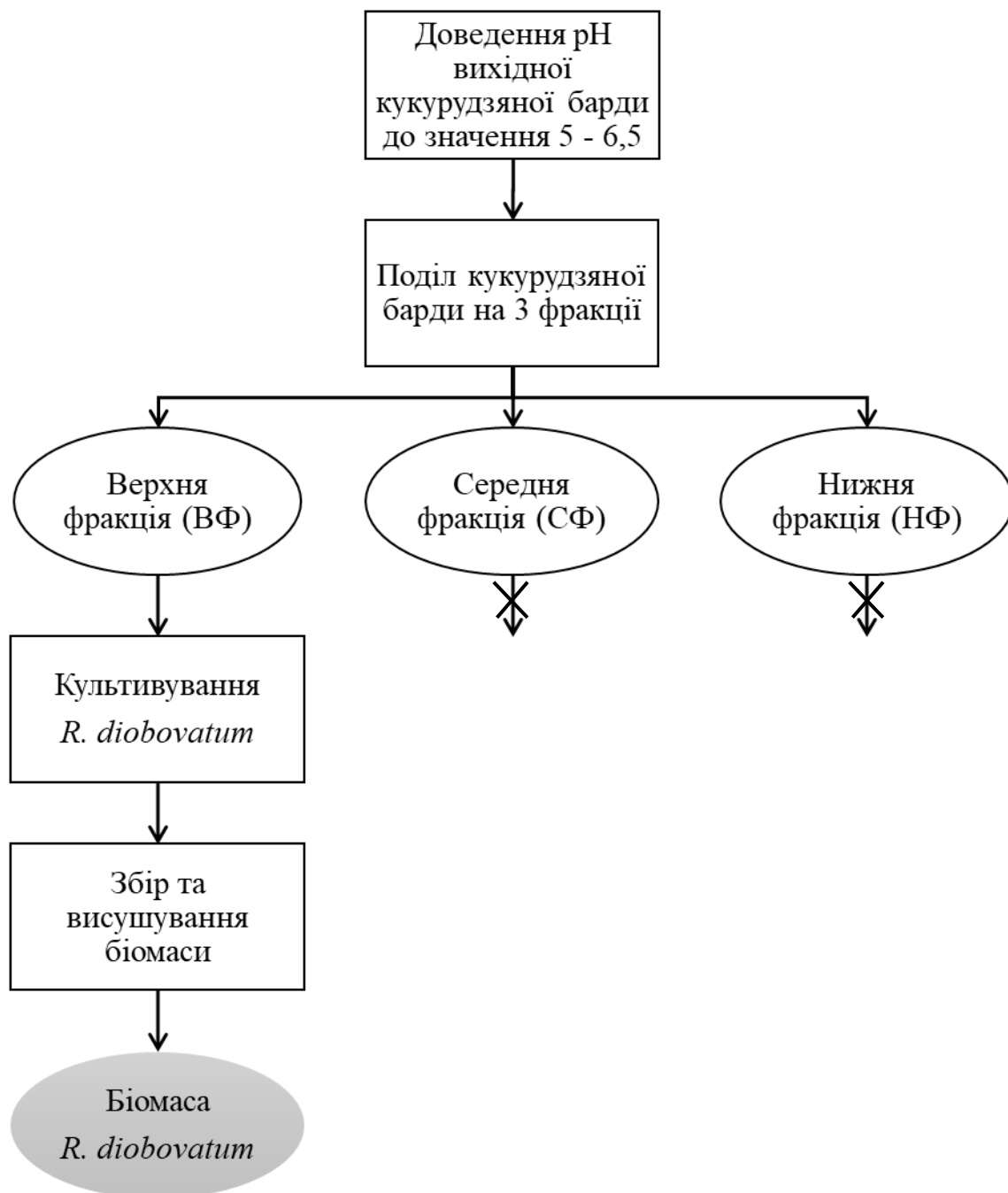


ДОДАТОК 4

Способи оптимізації кукурудзяної барди

Способи оптимізації кукурудзяної барди, що дозволяють збільшити вихід біомаси дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* ІМВ У-5023 на 80%

(умови культивування дріжджів: 3-5 діб при температурі 22°C, на орбітальній качалці при 150 об/хв; вміст загальних ліпідів у верхній фракції барди (ВФ) 300-350 мг/мл)



ДОДАТОК 5

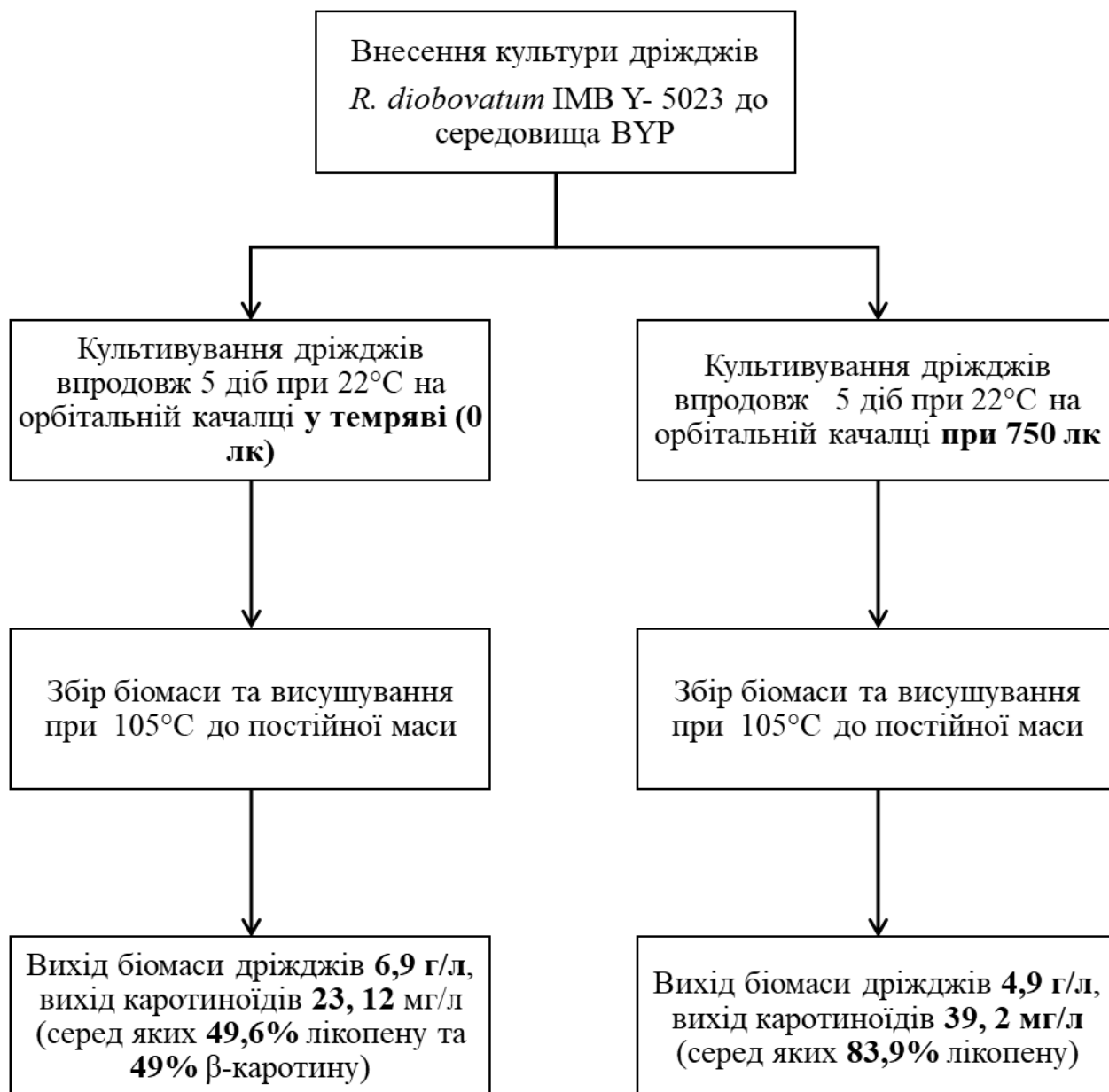
**Отримання біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodosporidium diobovatum*
IMB Y- 5023 за культивування на різних живильних середовищах**

Отримання біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* ІМВ У- 5023 за культивування на живильному середовищі УМ



Отримання біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* ІМВ У- 5023 за культивування на живильному середовищі

ВУР



Отримання біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y- 5023 за культивування на живильному середовищі СМ

